ORSAY
n° d'ordre :
1473

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée

Pour obtenir

Le GRADE de DOCTEUR ES-SCIENCES-NATURELLES

PAR

Madame NINIO née MEVEL Maryvonne

SUJET : 1° Propriétés structurales et fonctionnelles de dérivés du flavocytochrome b2. Association de hème et /ou FMN aux chaines combinées ou isolées.
2° Rôle essentiel de l'ATPase membranaire de E. coli en anaérobiose comme facteur de couplage énergétique.

soutenue le 28 AVRIL 1975 devant la Commission d'examen

MM. TONNELAT Président

SHECHTER

Mme LAREYRIE

BURSTEIN

COHEN

ORSAY
n° d'ordre :
1473

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée

Pour obtenir

Le GRADE de DOCTEUR ES-SCIENCES-NATURELLES

PAR

Madame NINIO née MEVEL Maryvonne

SUJET : 1° Propriétés structurales et fonctionnelles de dérivés du flavocytochrome b2. Association de hème et /ou FMN aux chaines combinées ou isolées.
2° Rôle essentiel de l'ATPase membranaire de E. coli en anaérobiose comme facteur de couplage énergétique.

soutenue le 28 AVRIL 1975 devant la Commission d'examen

MM. TONNELAT Président

SHECHTER

Mme LAREYRIE

BURSTEIN

COHEN

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

REMERCIEMENTS

La première partie de ce travail a été effectuée au Centre de Génétique Moléculaire du C.N.R.S., dirigé par Monsieur le Professeur P. SLONIMSKI, dans le groupe d'Enzymologie physico chimique qu'anime Madame F. LABEYRIE. Je tiens à remercier Monsieur P. SLONIMSKI pour m'avoir accueilie au Centre de Génétique Moléculaire.

Je remercie vivement Messieurs E. SHECHTER, J. TONNELAT, G. COHEN et C. BURSTEIN qui ont accepté de consacrer un peu de leur temps à l'examen de ce manuscrit.

Madame F. LABEYRIE a su diriger mes premiers pas dans la recherche avec une compétence et un enthousiasme dont je lui suis très reconnaissante. Je la remercie également pour la grande liberté qu'elle m'a laissée dans mon travail, et pour sa gentillesse qui m'a aidée à surmonter les moments pénibles.

Je remercie également Monsieur M. IWATSUBO, pour sa collaboration très précieuse et l'intérêt constant qu'il a porté à cette étude.

Monsieur le Professeur M. KAMEN m'a invitée et accueillie à "L'University of California San Diego". Je le remercie pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail et pour ses encouragements constants.

Monsieur le Professeur R. VALENTINE m'a accueilie pendant deux ans dans son laboratoire. Il a dirigé la deuxième partie de mon travail et il a été pour moi un pédagogue lucide, patient et d'une gentillesse extraordinaire. Je lui exprime ma reconnaissance pour tout ce qu'il m'a enseigné.

Je remercie également T. YAMAMOTO avec qui j'ai collaboré pendant près de deux ans et à qui je dois mes progrès en anglais.

La préparation de ce manuscrit a bénéficié de l'aide particulièrement efficace de D. LAPOINTE et de S. CHEVAIS.

Je n'oublie pas enfin mes camarades de laboratoire avec qui j'ai vécu pendant ces quelques années et qui m'ont entouré de leur affection chaleureuse.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548119_0014

TABLE DES MATIERES

PROPRIETES STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DE DERIVES DU FLAVOCYTOCHROME b_2
ASSOCIATION D'HEME ET/OU FMN AUX CHAINES COMBINEES OU ISOLEES 1

INTRODUCTION 2

CHAPITRE I : Structure en sous-unités du flavocytochrome b_2 : Etude par ultracentrifugation analytique en milieu dénaturant 9

Article I : Subunit structure of L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2) of Saccharomyces cerevisiae Ultracentrifugation studies. 13

CHAPITRE II : Dissociation des groupements prosthétiques du flavocytochrome b_2 :
A - Reconstitution de l'hémoprotéine (déflavocytochrome b_2) 22

Article II : Reconstitution of cytochrome b_2 following prosthetic groups dissociation by guanidine hydrochloride, protoheme binding 25

CHAPITRE III : Dissociation des groupements prosthétiques du flavocytochrome b_2 :
B - Reconstitution de la flavoprotéine (dehemocytochrome b_2) et étude de ses propriétés spectrales et catalytiques. 32

CHAPITRE IV : Caractérisation des deux globules α et β du flavocytochrome b_2 par refixation d'hème et de flavine 43

CONCLUSION GENERALE 49

Références bibliographiques hors articles 55

ROLE ESSENTIEL DE L'ATPase MEMBRANAIRE DE E. COLI EN ANAEROBIOSE COMME FACTEUR DE COUPLAGE ENERGETIQUE 58

INTRODUCTION 59

CHAPITRE I : Mise en évidence du rôle essentiel de l'ATPase dans la croissance anaérobique et dans le transport anaérobique d'aminoacides par l'étude de mutants de E.coli dépourvus d'ATPase. 68

Article I : Essential role of membrane ATPase or coupling factor for anaerobic growth and anaerobic active transport in Escherichia coli 72

Additif à l'article I 81

CHAPITRE II : Transformation de vésicules effectuant le transport actif d'aminoacides en vésicules effectuant la phosphorylation oxydative 82

Introduction et complément à l'article II 83

1 - Description des vésicules préparées selon la méthode de Kaback 84
2 - Transport actif de proline dans des vésicules membranaires préparées selon Kaback 85
3 - Préparation de vésicules selon Gibson 86

Article II : Conversion of active transport vesicles of Escherichia coli into oxidative phosphorylation vesicles. 87

CHAPITRE III : Role de l'ATPase dans la synthèse du DNA chez E. coli. 91

Article III : Energy requirement for biosynthesis of DNA in E.coli : role of membrane-bound energy-transducing ATPase (coupling factor) 94

CONCLUSION GENERALE 106

Références bibliographiques hors articles 113

PROPRIETES STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DE DERIVES DU FLAVOCYTOCHROME b_2

Association d'hème et/ou FMN aux chaines combinées ou isolées.

I N T R O D U C T I O N

La membrane interne des mitochondries contient les éléments de systèmes multienzymatiques tels que les chaines respiratoires, les systèmes de phosphorylation oxydative, les systèmes de transport actif de métabolites. La difficulté rencontrée pour l'étude de ces systèmes vient du fait que, d'une part leurs constituants sont en général très insolubles, d'autre part s'il est possible de solubiliser séparément chaque constituant d'un système, il est difficile de reconstituer et de faire fonctionner in vitro le système.

La L-lacticodéshydrogénase trouvée dans les mitochondries de la levure Saccharomyces cerevisiae constitue un cas un peu particulier en ce sens qu'elle peut être solubilisée très aisément. Elle présente par ailleurs quelques caractéristiques qui rendent son étude très intéressante. Contrairement aux lactico-déshydrogénases trouvées dans les tissus animaux et dans de nombreuses bactéries, son fonctionnement n'est pas lié aux coenzymes de type NAD ou NADP, mais elle possède des quantités équimoléculaires de flavine mononucléotide (FMN) et de protohème (1-3). Elle est trouvée dans la levure à côté de deux D-lacticodéshydrogénases à zinc et FAD (4, 5). L'une est présente dans le cytoplasme de la levure anaérobie (6,7) ou aérobie (8). Elle oxyde le D-lactate en présence de ferricyanure mais pas en présence de cytochrome c. L'autre, présente dans la levure aérobie seulement, est fixée sur la membrane mitochondriale et transfère les électrons du D-lactate au cytochrome c (9). La L-lacticodéshydrogénase est trouvée dans la levure aérobie et transfère les électrons du L-lactate au cytochrome c ainsi qu'à d'autres accepteurs comme le ferricyanure ou le 2, 6-dichlorophénolindophénol (6, 10). Son étude fut favorisée par rapport à l'étude des D-lacticodéshydrogénases principalement à cause du fait que ces deux dernières s'avérèrent très instables et difficiles à purifier.

Une activité L-lacticodéshydrogénasique avait été découverte dans la levure de boulangerie dès 1928 (11). En 1942 Bach, Dixon et Keilin entreprenaient la purification de cette lacticodéshydrogénase et découvraient que son fonctionnement était lié à un constituant cytochromique (12). Son étude a bénéficié d'un mode de

purification très simple mis au point par Appleby et Morton (1) et qui consistait en une cristallisation à faible force ionique d'un extrait partiellement purifié. Dans le même temps Appleby et Morton d'une part (1), Boéri et al. d'autre part (3) découvraient que le fonctionnement de cet enzyme était lié à un groupe prosthétique flavine mononucléotide (FMN) présent en quantité équivalente au groupe prosthétique héminique : de là le nom de "flavocytochrome b_2" . L'intérêt de l'étude de cette L-lacticodéshydrogénase s'en trouvait considérablement accru. En effet Morton et al. (2) firent l'hypothèse qu'elle pourrait résulter de l'association d'une déshydrogénase à flavine et d'un élément cytochromique. Le système L-lactate, flavocytochrome b_2, cytochrome c apparaitrait alors comme une minichaine respiratoire soluble et pouvant être étudiée in vitro.

En France, une étude physiologique du flavocytochrome b_2 fut entreprise dès 1953 par P. Slonimski et al (6, 7, 13) alors qu'ils étudiaient le mécanisme de formation des chaines respiratoires chez la levure. Ils montrèrent que l'activité lactate cytochrome c réductasique est réversiblement inductible par l'oxygène (13). Plus tard M. Somlo (14) montra que la synthèse du flavocytochrome b_2 est contrôlée par le lactate.

M. Somlo et P. Slonimski (15) observèrent que certaines propriétés de l'enzyme étaient brutalement modifiées au cours de sa purification ; plus précisément au stade de dialyse à faible force ionique provoquant la cristallisation ; en particulier le K_m et le K_I vis à vis du L-lactate comme substrat et comme inhibiteur. Par la suite, Symons et al (16) montraient qu'il en est de même pour la mobilité électrophorétique et que la modification était nécessaire pour que la protéine puisse cristalliser. Récemment la nature de cette transition (coupure hydrolytique par les protéases contaminantes) a été élucidée (53).

P. Pajot et M. Claisse (17) ont récemment trouvé que le flavocytochrome b_2 participe dans la mitochondrie de levure au fonctionnement d'une "chaine respiratoire secondaire". Ils observèrent en effet que, malgré un blocage de la chaine respiratoire principale au niveau du cytochrome b par l'antimycine A, la levure peut pousser néanmoins à condition que le lactate soit la source d'énergie

respirée. Cette "chaine respiratoire secondaire" partage le cytochrome c et la cytochrome oxydase avec la chaine respiratoire principale et est couplée avec un site de phosphorylation oxydative. A elle seule cette chaine permet d'assurer la croissance de la levure.

Les études physiologiques du flavocytochrome b_2 ont été relativement peu poussées. Au moment où le travail constituant cette thèse a débuté les équipes travaillant sur le flavocytochrome b_2 (celles de Mahler et de Sturtevant aux Etats Unis, Ogura et Nakamura au Japon, Iwatsubo, di Franco et Capeillère, Labeyrie et Baudras en France) s'intéressaient principalement, d'une part à l'étude de sa structure, d'autre part au mécanisme de transfert des électrons du L-lactate au cytochrome c et au rôle de la flavine et de l'hème dans ce transfert.

Les résultats accumulés dans les laboratoires de F.Labeyrie (18-20) et de F. Lederer (21) font admettre que le flavocytochrome b_2 est un tétramère de poids moléculaire 235 000 - 240 000, chaque protomère portant un hème et une flavine. La participation de l'hème et de la flavine à la réaction catalytique a été étudiée depuis de nombreuses années et les connaissances acquises aujourd'hui sur ce problème sont les suivantes :

1) l'hème et la flavine sont tous deux réduits en présence de lactate et sont réoxydables par les accepteurs d'électrons (22,23) comme le ferricyanure ou le cytochrome c. Il est acquis qu'ils participent à la réaction enzymatique.

2) la perte du FMN a été observée être liée à la perte de l'activité enzymatique ; celle-ci étant restaurée si on refixe le FMN (24). En absence de FMN l'hème ne peut être réduit. Il semblait donc que la flavine joue un rôle essentiel dans la catalyse enzymatique et est située avant l'hème comme accepteur des électrons. Cependant ce résultat n'est pas certain puisque l'on a observé entre la flavine et le substrat des interactions coopératives réciproques. Ainsi la perte du FMN aboutit à la perte de l'affinité pour le substrat (25, 26).

3) l'hème joue un rôle essentiel pour le passage des électrons du L-lactate au cytochrome c, mais ne semble pas nécessaire pour le passage des électrons au ferricyanure. Ceci a été démontré

par J.P. Forestier et A. Baudras (27) sur des dérivés contenant des taux variables d'hème et de flavine.

Nous verrons dans l'exposé suivant comment nous avons tenté de résoudre le problème du rôle de l'hème et de la flavine dans la catalyse enzymatique. Nous avons réussi à fabriquer des dérivés dépourvus de l'un ou l'autre des groupes prosthétiques, grâce à une dénaturation dans la guanidine 6 M. Il est apparu que cette dénaturation est réversible à 80 % (d'après le test de l'activité molaire). Au cours de la dénaturation, le FMN et l'hème se dissocient et peuvent être éliminés, ce qui conduit à l'obtention d'une apoprotéine. Une dialyse dans un tampon approprié permet de renaturer l'enzyme en refixant sur lui l'un ou l'autre des groupes prosthétiques

L'obtention d'un dérivé flavoprotéique dans lequel la flavine semble s'être refixée comme sur le flavocytochrome b_2 natif et qui possède une activité enzymatique importante a été d'un intérêt considérable pour déterminer le rôle de la flavine dans le passage des électrons du L-lactate aux accepteurs. Nous avons pu mettre en évidence également que l'hème joue un rôle essentiel non seulement quand le cytochrome c est l'accepteur des électrons, mais aussi quand c'est le ferricyanure qui est l'accepteur des électrons.

La compréhension du mécanisme réactionnel posait de nombreux problèmes. En effet, le flavocytochrome b_2 peut accepter sur chaque protomère 3 électrons (2 pour la flavine et 1 pour l'hème) ; or le substrat est un donneur à 2 électrons. Comment les électrons sont-ils transférés entre les différents groupes prosthétiques ? Ce problème vient d'être résolu par les études de C. Capeillère-Blandin, R.C. Bray, M. Iwatsubo, et F. Labeyrie (28-30). Ces auteurs ont montré que, pendant la réaction catalytique, le flavocytochrome b_2 accepte seulement 2 électrons par protomère qui sont transférés du L-lactate à la flavine. La flavine les transfère ensuite un à un à l'hème de façon intramoléculaire. La formation d'une flavine semi-quinone au cours du transfert des électrons était connue depuis déjà plusieurs années (31). Il a été démontré que cette flavine semiquinone se forme par le transfert d'un électron depuis la flavine totalement réduite jusqu'à l'hème. Ce mécanisme réactionnel est retrouvé dans certains flavoenzymes (xanthine oxydase, succinate déshydrogénase) dont une des fonctions principales consiste à disperser deux électrons initialement appariés (32-34).

Puisque deux groupements prosthétiques participent à la réaction, la compréhension détaillée du mécanisme de transfert des électrons exige de connaître 1) les orientations spatiales et les distances relatives des deux groupements hème et FMN ; 2) le mode de fixation de la flavine à la chaine polypeptidique et les interactions FMN-substrat ; 3) la liaison de l'hème avec la protéine, c'est à dire la nature des ligands hématiniques et la structure de la chaine polypeptidique entourant l'hème.

Le premier problème a été étudié par J.L. Risler, M. Iwatsubo et O. Groudinsky (35-37) par différentes méthodes spectroscopiques ; fluorescence, phosphorescence, dichroisme naturel et magnétique. Il a été possible d'apporter des arguments indiquant que les hèmes et les flavines sont sans doute proches et dans des plans approximativement perpendiculaires, mais leur distance mutuelle n'a pu être déterminée. Nous avons tenté dans ce travail d'observer une interaction entre l'hème et la flavine, puisque nous disposions de dérivés dépourvus de l'un ou l'autre des groupements prosthétiques.

En ce qui concerne le problème n°2;mode de fixation de la flavine, très peu de choses sont connues actuellement, si ce n'est l'interaction L-lactate-FMN.

Quant au problème n° 3 ;liaison de l'hème avec la protéine, le problème a été résolu grâce à un dérivé du flavocytochrome b_2 obtenu par hydrolyse trypsique.

Ce dérivé de masse moléculaire 11 000 est nommé "noyau cytochromique b_2". Il contient le site de l'hème dans son intégrité. Des expériences de photooxydation effectuées par O. Groudinsky (38, 39) ont permis de montrer que l'un au moins, ou deux des ligands de coordination du fer est une histidine. Récemment l'observation des spectres optiques et RPE (40,41) ont mis en évidence une grande similitude dans la structure du chélate fer-hème-protéine dans le noyau cytochrome b_2 et dans le cytochrome b_5. Le cytochrome b_5 est extrait des microsomes de mammifères et fonctionne comme accepteur spécifique d'une flavodéshydrogénase ; la NADH cytochrome b_5 réductase. Des études ultérieures de séquence d'acides aminés et de RMN (42) ont révélé, d'une part une homologie considérable entre les séquences des deux noyaux cytochromiques b_2 et b_5, d'autre part une topologie voisine de la région du site héminique et de l'entourage d'un tryptophane enfoui.

Dans le travail présenté ci-dessous, nous avons 1) examiné le problème de la masse moléculaire du flavocytochrome b_2 et de sa structure en sous-unités. Le traitement par la guanidine 6 M en vue de dissocier totalement la protéine nous a permis d'observer que les groupements FMN et hème se dissociaient réversiblement et d'autre part nous avons observé que la dénaturation était réversible. Aussi avons-nous 2) préparé un dérivé apoprotéique sur lequel nous avons étudié la refixation de l'hème. 3) Nous avons préparé un dérivé flavoprotéique dépourvu d'hème et étudié ses propriétés spectrales et cinétiques. Enfin 4) nous avons séparé les deux chaines α et β du flavocytochrome b_2 et tenté de localiser sur quelle chaine se trouvent fixés l'hème et la flavine.

C H A P I T R E I

STRUCTURE EN SOUS-UNITES DU FLAVOCYTOCHROME b_2 :

ETUDE PAR ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE EN MILIEU DENATURANT

La masse moléculaire du flavocytochrome b_2 a fait l'objet d'un certain nombre de déterminations. Les premières, effectuées dans le laboratoire de Morton en 1963 (43) par des méthodes hydrodynamiques aboutissaient à une "meilleure estimation" de 183 000 daltons. Cette estimation s'est révélée par la suite inexacte. En effet, elle était calculée en utilisant une valeur fausse du volume partiel spécifique de l'enzyme et de plus elle n'était pas extrapolée à concentration nulle en protéine.

D'autre part la masse protéique associée à une mole d'hème et de flavine avait été estimée comme étant égale à 80 000 g (44). Ces mesures avaient conduit à considérer le flavocytochrome b_2 comme un dimère portant sur chaque monomère un hème et une flavine. Cependant au moment de mon arrivée dans le laboratoire, cette image du cytochrome b_2 fut remise en question par un certain nombre d'observations.

En effet, on avait pu obtenir par hydrolyse trypsique une coupure du flavocytochrome b_2 avec séparation d'une hémoprotéine de masse moléculaire 11 000 appelée "noyau cytochromique b_2" (45). Toutes les études spectrales tendaient à montrer que l'absorbance spécifique de l'hème n'était pas modifiée au cours de ce traitement. Cependant le coefficient d'aborption de l'hème réduit de ce noyau cytochromique b_2 avait été trouvé très différent de celui publié par Armstrong pour le cytochrome b_2 entier : 158 (46) et 232 $mM^{-1}cm^{-1}$ (44) respectivement. Cette différence conduisit P. Pajot et O. Groudinsky à redéterminer le coefficient d'extinction du cytochrome b_2 qu'ils trouvèrent égal à 183 $mM^{-1}cm^{-1}$ (20), valeur 30 % plus faible que la valeur trouvée par Armstrong. La masse protéique par hème fut également redéterminée et trouvée alors égale à 58 600 g (20).

Simultanément C. Monteilhet et J.L. Risler (18) redéterminèrent d'une part le volume partiel spécifique du flavocytochrome b_2 trouvé égal à 0.754 cm^3/g à 25°C, au lieu de la valeur de 0.71cm^3/g utilisée par Armstrong et coll (47). D'autre part, ils redéterminèrent la masse moléculaire du flavocytochrome b_2 (18) par diffraction des rayons X sur des poudres cristallines de flavocytochrome b_2. La mesure de la densité des cristaux et du volume partiel spécifique

de la protéine leur permit de déduire une masse moléculaire égale à n x (117 300) avec n égal à 1, 2 ou 4.

Dans le même temps C. Jacq et F. Lederer (21) déterminèrent la composition en acides aminés du flavocytochrome b_2. Ils évaluèrent ainsi que la masse protéique minimum associée à une mole d'hème, en utilisant le nouveau coefficient d'extinction de l'hème, était 53 000 g.

Pour notre part, nous avons redéterminé la masse moléculaire du cytochrome b_2 par la méthode classique d'équilibre d'ultracentrifugation. La méthode développée par Yphantis (48) permet de travailler avec des concentrations protéiques très faibles et d'éviter ainsi la formation d'aggrégats. Les expériences d'Armstrong et coll (43) suggéraient en effet que l'enzyme en solution a une nette tendance à former de tels aggrégats. Comme il est montré dans l'article suivant, la masse moléculaire du flavocytochrome b_2 a été trouvée égale à 240 000 $\pm$ 10 000. Cette valeur permet d'attribuer au coefficient n des expériences de diagramme de poudres de Monteilhet et Risler (18) la valeur n = 2 et d'en déduire un poids moléculaire de 234 000 $\pm$ 8 000, en très bon accord avec nos résultats.

Toutes ces mesures effectuées selon des méthodes très différentes sont en très bon accord. Elles ont permis d'établir de façon tout à fait certaine que le flavocytochrome b_2 n'est pas un dimère mais un tétramère. La meilleure estimation du poids moléculaire est 235 000 $\pm$ 8 000 ; chaque monomère portant un hème et un FMN a un poids moléculaire de 59 000 daltons $\pm$ 2 000.

Nous avons entrepris d'autre part de déterminer la structure du cytochrome b_2 en sous-unités. La présence de sous-unités de poids moléculaires très petits (17 000 et 34 000) par rapport à la taille admise alors pour le monomère (80 000) avait déjà été montrée par A. Baudras et F. Labeyrie (49). Nous avons pour notre étude utilisé les techniques de l'ultracentrifugation en milieu dissociant; guanidine 6 M et β mercaptoethanol. Cette méthode s'est avérée très laborieuse. Cependant nous avons obtenu des résultats voisins de ceux trouvés parallèlement par F. Lederer et A.M. Simon (50). Ces auteurs avaient séparé les chaines carboxyméthylées du flavocytochrome b_2 sur colonne de Séphadex,

puis estimé leurs poids moléculaires par électrophorèse sur gel d'acrylamide en sodium dodécyl sulfate en utilisant la méthode qui venait d'être développée par Shapiro (51), puis Weber et Osborn (52).

Les études du flavocytochrome b_2 en milieu guanidine 6 M nous ont permis d'observer des propriétés intéressantes que nous avons utilisées dans la suite de notre travail. Il est apparu en effet qu'en guanidine 6 M le groupe prosthétique héminique se dissocie réversiblement.

Signalons qu' à la suite de ce travail, il a été démontré que la présence de ces 2 chaines différentes était le résultat d'une coupure protéolytique d'une chaine unique de masse environ 59 000 constituant le monomère (53). Cette coupure est effectuée par les protéases contaminantes au cours de la préparation de l'enzyme.

Eur. J. Biochem. 25 (1972) 254—261

Subunit Structure of L-Lactate Dehydrogenase (Cytochrome b_2) of *Saccharomyces cerevisiae*

Ultracentrifugation Studies

Maryvonne MÉVEL-NINIO

Centre de Génétique Moléculaire du Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette

(Received November 2, 1971)

The molecular weights of yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2) and of its polypeptide chains have been measured by ultracentrifugation. The intact protein was found to have a molecular weight of 240000 ± 10000 by sedimentation equilibrium measurements according to the Yphantis high-speed method. The solution obtained by dissolving the protein in 6 M guanidine (with added 2-mercaptoethanol) behaved as if it were monodisperse, giving M_r = 31300 ± 2000, by approach-to-equilibrium measurements. This result indicates that the "58600 unit" associated to one set of prosthetic groups, heme and flavin, is made up of two chains, and thus the whole molecule contains a total of eight chains, identical or not. However, as the viscosity of the medium was reduced (using 2 M guanidine) the paucidispersity of the cytochrome b_2 solution was revealed. The mixture was shown to consist of two kinds of chains distinct in molecular weight. From these experiments the molecular weight of the light chain was found to be 22600 ± 1500. After partial separation of the two chains by gel filtration through Sephadex G-100, the molecular weight of the heavy chain was estimated as 39700 ± 3000.

Preliminary experiments indicate that the heavy component can bind quantitatively the heme prosthetic group. The FMN appears to be bound to the light component.

Cytochrome b_2 (yeast L-lactate cytochrome *c* oxidoreductase) is an enzyme known to contain both heme and FMN as prosthetic groups [2,3]. Its molecular weight was found to be 234600 ± 8000 [4] by X-ray diffraction studies which also showed that it is composed of either two or four identical moieties. The molecular weight associated to one set of prosthetic groups (heme and flavin) was found to be 58600 ± 2000 [5,6].

Studies of the subunits detectable in dissociating media were undertaken by Baudras and Labeyrie [7]. They observed that, when exposed to 2.3 M urea or 0.75 M guanidine, cytochrome b_2 exhibits two boundaries in the analytical ultracentrifuge with $s_{20,w}$ = 1.5 S and 9 S, whereas only one (≈ 9 S) was observed in 0.1 M phosphate buffer. Preliminary molecular weight determinations in 2 M guanidine by the approach-to-equilibrium technique showed the presence of two components with apparent molecular weights 34000 and 18000 [7]. No explicit image of the quaternary structure of cytochrome b_2 could then emerge from these studies, the possibility remaining that the "34000" unit was not yet fully dissociated in such low guanidine-HCl concentrations. However, the existence of subunits of molecular weight as low as 20000 was clearly apparent.

In order to get more precise information we have performed a detailed study on the subunit structure of cytochrome b_2 in its crystallisable form. We attempted to characterize the molecular weights of the subunits in dissociating media at various concentrations of guanidine (2—6 M) by ultracentrifugation techniques. Each monomer of $M_r \approx 58600$ is shown to consist of two chains of M_r 22600 ± 1500 and 39700 ± 3000, respectively. The two chains are clearly resolved in 2 M guanidine. In the more usual 6 M concentration for guanidine, the results were consistent with these, but the high viscosity of the medium did not allow a clear separation of the chains. In this case, one could only estimate a weight-average molecular weight of 31300 ± 2000.

Moreover, preliminary studies have shown that, after Sephadex G-100 chromatography in 2 M guanidine, the heavier chain can rebind heme quantitatively, once isolated and renaturated, while the lighter chain seems to rebind the FMN prosthetic group.

A preliminary account of the present work was presented at the Third International Symposium on Flavins and Flavoproteins (Durham, N. C., October 1969) [1].

Enzyme. L-Lactate : cytochrome *c* oxidoreductase or cytochrome b_2 (EC 1.1.2.3).

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

A preparation of crystalline cytochrome b_2 (type II) was made according to Appleby and Morton [8] with the modifications proposed by Spyridakis *et al.* [9]. The enzyme was kept at 0 °C as an ammonium sulfate precipitate.

For the equilibrium runs in non-dissociating buffer, the ammonium sulfate precipitate of cytochrome b_2 was centrifuged and the precipitate was dissolved in a 0.1 M phosphate, 20 μM EDTA buffer pH 7.2 at 0 °C. This solution was dialysed against the same buffer for 24 h at 0 °C.

For the experiments performed in dissociating medium, the centrifuged cytochrome b_2 precipitate was dissolved in the guanidine-HCl solution. The protein solution was then allowed to dialyse against the same solvent for ≈ 45 h at 25 °C with one change after 10 h. The final dialysis medium was used for subsequent dilutions of the protein solution (the protein concentration was 3—9 mg/ml for the Archibald experiments and about 0.1—1 mg/ml for the equilibrium experiments) and as reference solvent in the ultracentrifugation runs.

Carboxymethylated cytochrome b_2 was also prepared according to Crestfield *et al.* [10] at pH 8.6. The enzyme was then dialysed against a 4 M guanidine-HCl solution at pH 3.5 and 25 °C before the ultracentrifugation runs.

The guanidine hydrochloride (Carlo Erba) solutions were prepared either in a neutral buffer: 0.1 M phosphate, 20 μM EDTA, 0.1 M 2-mercaptoethanol, pH 7.2, or in an acid one: 66 mM formate, 20 μM EDTA, 0.1 M 2-mercaptoethanol, pH 3.5. An ultrapure material (Mann Research laboratories) was used for the equilibrium runs when the absorption of the protein (at 280 nm) was observed. The 2-mercaptoethanol was purchased from Fluka. All other reagents were analytical grade.

METHODS

All sedimentation studies were carried out using a Spinco Model-E analytical ultracentrifuge.

Sedimentation-Equilibrium Experiments

For the measurements on cytochrome b_2 in non-dissociating medium the Rayleigh interferometric system and the Yphantis [11] high-speed method were used. The speed, 15000 rev./min was chosen according to Yphantis' recommendations for a molecular weight of 230000. We used double-sector cells with sapphire windows. The two cells were filled; one with 0.02 ml FC 43 and 0.1 ml of the protein solution, and the other one with 0.01 ml FC 43 and 0.12 ml of the dialysis buffer. After the equilibrium was reached, several interference patterns were photographed on Kodak spectroscopic plates, emulsion type II-G. Fringe displacements were measured as a function of the radial position in the cell with a Nikon two-dimensional microcomparator model 6C. With the rotor speeds we used, the upper meniscus was fully depleted, so that protein concentrations could be taken as directly proportional to fringe displacements. The apparent weight-average molecular weight, M_w, was determined from the slope of a plot of ln (f) *vs* r^2.

$$M_{w\,(app)} = \frac{2RT}{(1-\bar{v}\varrho)\omega^2}\,\frac{d\ln f}{dr^2} \qquad (1)$$

where ϱ is the density of the solvent, ω the angular velocity of the rotor, and f the fringe displacement at the distance r from the center of rotation.

For the experiments on cytochrome b_2 in dissociating medium (guanidine, 2-mercaptoethanol), we used the absorption system, and the low-speed method. Two simple centrifugation cells (12-mm, 4 ° sectors) were filled, one with 0.05 ml FC 43 and 0.18 ml protein solution, and the other one with 0.03 ml FC 43 and 0.21 ml guanidine-HCl buffer dialysis solution. Absorption patterns were photographed on commercial Kodak films and interpreted with an automatic recording microdensitometer Joyce Loebl model MK III C. The linearity of the response was checked for all the range of protein concentrations we used. The molecular weight was obtained from the slope of a plot of ln c (r) *vs* r^2 using Equation (1) in which f is replaced by c (r), the protein concentration.

The Approach-to-Equilibrium Experiments

These were carried out according to the Archibald method, using schlieren optics. The sectors of a double-sector centrifugation cell (18-mm, 2 ° sectors) were equally filled, using a graduated Agla micrometer syringe; one with the protein solution, and the other one with the solvent. The speeds and times of centrifugation were chosen according to Labar [12]. After the full speed was reached, photographs of the cells were recorded at different times. The rotor was then accelerated to a higher speed (59780 rev./min), allowing the whole protein to sediment away from the meniscus. The area of the boundary, after the usual corrections for radial dilution, gives a value X^{*0}, proportional to the initial protein concentration, c^0.

The Archibald patterns were analyzed according to Klainer and Kegeles [13]. The two quantities X^* and Y^* are computed at different centrifugation times and for various speeds. X^* is proportional to the total concentration of the protein which sedimented away from the meniscus at the time considered. At the same time, and for the same rotor speed ω, Y^* is proportional to $(dc/dr)_m/\omega^2 r_m$ where $(dc/dr)_m$ is the protein concentration gradient at the meniscus.

The following relation holds for monodisperse solutions:

$$Y^* = -X^* (s/D) + X^{*0} (s/D) \qquad (2)$$

where $(X^{*0} - X^*) = c_m$ is the protein concentration at the meniscus and s and D are the sedimentation and the diffusion coefficients, respectively. The plot of Y^* *vs* X^* is linear, the slope is $(s/D)_{app}$. The molecular weight and (s/D) values of a component are related together by:

$$(s/D)_{app} = M_{app} (1 - \bar{v}\varrho)/RT = \frac{(dc/dr)_m}{\omega^2 r_m \cdot c_m} \qquad (3)$$

For a two-component 1,2-paucidisperse system (heavy component = 1, light component = 2), as shown by Erlander and Foster [14], one obtains two linear regions (Fig. 5) from which the $(s/D)_{z\,1,2}$, $(s/D)_{w\,1,2}$ and $(s/D)_2$ values can be calculated. However, in a number of cases, the linear region corresponding to the light component cannot be explored experimentally. In such a case, the X^{*0} coordinate is used as a test for homogeneity. Indeed, if the line of the Erlander and Foster diagram does not extrapolate at X^{*0}, *i.e.* $c_m = c^0$, this means that the studied protein solution corresponds to a mixture of species distinct in molecular weight.

The value of the partial specific volume for type II cytochrome b_2 in phosphate buffer is $\bar{v} = 0.754$ cm³/g at 25 °C [4]. According to Kielley and Harrington [15], $\bar{v}$ for myosin in 5 M guanidine-HCl is smaller by about 0.01 cm³/g than the value for the native protein. On the other hand the partial specific volume increases with temperature by about 0.001 cm³/g per degree [16]. We thus assumed in our calculations a value of $\bar{v} = 0.74$ cm³/g for the protein in the guanidine-mercaptoethanol mixture at 20 °C. Using a value of $\bar{v}$ lower by 1% will reduce the molecular weight by about 7%.

The density of the solvents used in each ultracentrifugation run were measured with a precision digital densimeter (Parr, Gratz-Austria).

RESULTS

UNDISSOCIATED CYTOCHROME b_2

Equilibrium runs were carried out according to Yphantis [11]. The initial protein concentration was very small (0.18—0.8 mg/ml). A relatively high rotor speed (15000 rev./min) was used, reducing the concentration in the upper part of the solution column essentially to zero. The linearity of the plots of ln (fringe displacement) *vs* r^2 (Fig. 1) showed that the protein solution was homogeneous. The weight-average molecular weight at infinite dilution was estimated as 240000 ± 10000.

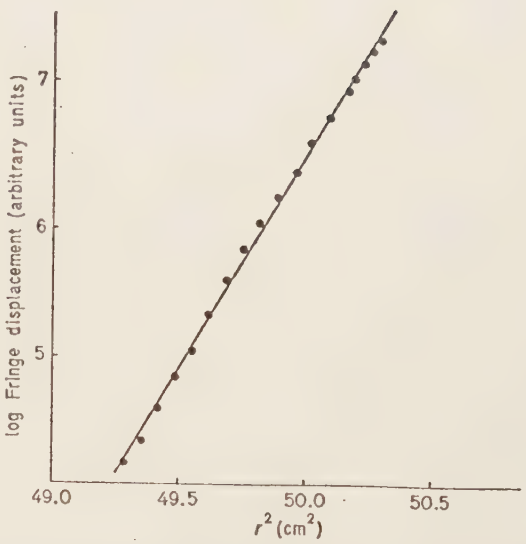


Fig. 1. *High-speed-equilibrium centrifugation : molecular weight of native cytochrome* b_2. The plot of $\log_{10}$ of fringe displacement *versus* the square of the radial distance (r^2) yields an apparent molecular weight of 238000 ± 8000. The solution of cytochrome b_2 (0.18 mg/ml) extensively dialysed against 0.1 M phosphate, 20 μM EDTA buffer pH 7.2 at 4 °C, was centrifuged in a column of 3.5 mm at 15000 rev./min and 4 °C for 46 h using interference optics and quartz windows

FULLY DISSOCIATED CYTOCHROME b_2

Sedimentation Studies in 6 M Guanidine

It is well known [17] that the non-covalent interactions in proteins are disrupted in highly concentrated (6 M) guanidine solutions. The polypeptide chains are then separated and behave as random coils. The presence of mercaptoethanol is necessary to break the disulfide bonds between the chains, when they exist, and to prevent their reforming by oxidation of the thiol groups.

When the equilibrium runs of cytochrome b_2 were carried out in such a medium (6 M guanidine-HCl, 0.1 M 2-mercaptoethanol) the linearity of the plots of ln $c(r)$ *vs* r^2 suggested that the solute is homogeneous in molecular weight (Fig. 2). In some cases however, the Erlander and Foster diagrams of the approach-to-equilibrium runs did not extrapolate at the X^{*0} coordinate (*i.e.* $c_m = 0$) (Fig. 3), even allowing for experimental errors, suggesting that the solute is inhomogeneous. The $M_{w\,(app)\,1,2}$ and $M_{z\,(app)\,1,2}$ calculated values were fairly close, (25400 and 29200, respectively, at 3.12 mg/ml).

As shown below, the solution is in fact paucidisperse, but cannot be resolved in a 6 M guanidine-HCl medium, because of its high viscosity.

The weight-average molecular weights, $M_{w\,(app)\,1,2}$ which are determined as apparent values, are given on Fig. 4 as a function of the protein concentration. The $M_{w\,1,2}$ value extrapolated to zero protein con-

Vol. 25, No. 2, 1972

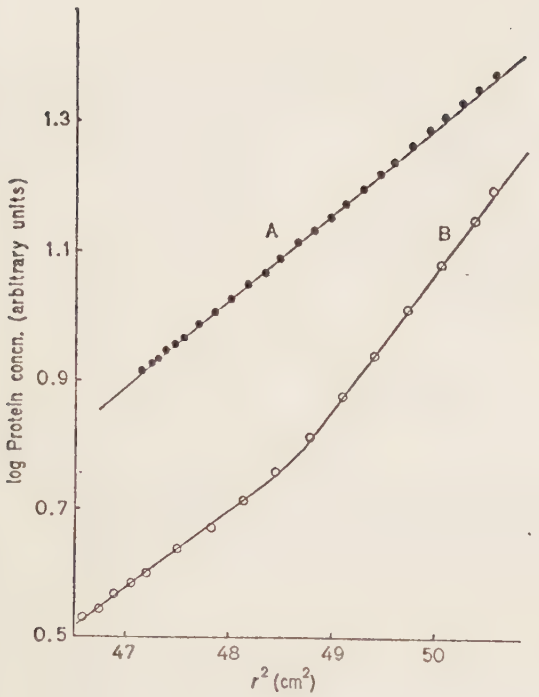


Fig. 2

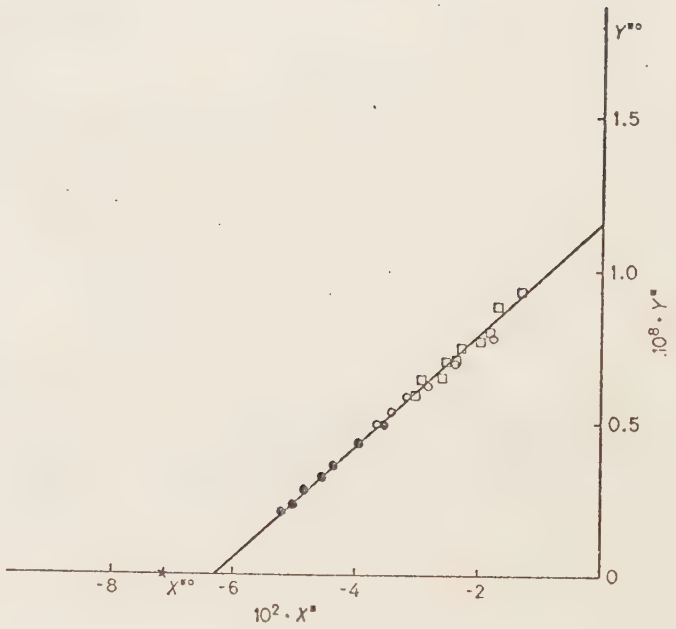


Fig. 3

Fig. 2. *Low-speed-equilibrium centrifugation : molecular weight of the subunits of cytochrome* b_2 *in 6 M and 4 M guanidine.* (A) The plot of $\log_{10}$ of protein concentration *versus* the square of the radial distance (r^2) yields an apparent molecular weight of 33000 ± 2000. The solution of cytochrome b_2 (8 mg/ml) was extensively dialysed against 0.1 M phosphate, 20 μM EDTA buffer pH 7.2 containing 6 M guanidine and 0.1 M 2-mercaptoethanol at 25 °C, then the excess of mercaptoethanol was removed just before the experiment through a Sephadex G-25 column (1 × 8 cm) equilibrated with the same buffer as above without mercaptoethanol. The protein solution was diluted to 0.8 mg/ml with the buffer equilibrating the Sephadex column and centrifuged in a column of 3 mm at 17000 rev./min and 25 °C for 85 h using the absorption system. (B) 4 M guanidine-HCl was used instead of 6 M. The slope of the curve at the left yields an apparent molecular weight of the light component of 21000

Fig. 3. *Approach-to-equilibrium centrifugation : molecular weight of the subunits of cytochrome* b_2 *in 6 M guanidine (Erlander and Foster diagram).* The plot is linear but does not extrapolate to the X^{*0} coordinate, showing that the protein solution is inhomogeneous. It yields an apparent weight-average molecular weight $M_{w\ (app)} = 25400$ and an apparent "Z-average" molecular weight $M_{z\ (app)} = 29200$. The solution of cytochrome b_2 dialyzed for 24 h against 66 mM formate, 20 μM EDTA buffer pH 3.5 containing 6 M guanidine-HCl and 0.1 M 2-mercaptoethanol at 25 °C was then diluted to 3.12 mg/ml with the same dialysis buffer. The protein solution was centrifuged in a double-sector cell (18 mm—2° sector) at several speeds and 20 °C using schlieren optics. □, 29500 rev./min; ○, 39460 rev./min; ●, 47660 rev./min; ✳, 59780 rev./min

centration was estimated as 31300 ± 2000 with $\bar{v} = 0.74$ cm^3/g ($M_{w\ 1,2} = 29100$ would have been obtained with $\bar{v} = 0.73$ cm^3/g). This result clearly demonstrates that the "58600" unit of cytochrome b_2 is made up of two chains identical or not and thus the whole 240000 molecule contains a total of eight chains.

Sedimentation Studies in 2—4 M Guanidine

Some equilibrium experiments were performed in a medium with low concentration of guanidine-HCl, (3—4 M). The plots of ln $c(r)$ *vs* r^2 (Fig. 2) were no longer linear. For the interpretation of our experiments, we used additionally the results of some approach-to-equilibrium runs carried out by Baudras in this laboratory [7], showing that the cytochrome b_2 in 2—4 M guanidine-HCl medium exhibits paucidisperse Erlander and Foster diagrams. From these diagrams, we calculated the $M_{w\ (app)\ 1,2}$, $M_{z\ (app)\ 1,2}$ and $M_{(app)2}$ values. For example, it was found: $M_{w\ (app)\ 1,2} = 25800$, $M_{z\ (app)\ 1,2} = 40200$; and $M_{(app)2} = 19700$ at a protein concentration of 4 mg/ml.

Some of our experiments were carried out in 4 M guanidine-HCl on carboxymethylated cytochrome b_2, to prevent any reoxidation of the sulfhydryl groups. As in the experiments in 6 M guanidine-HCl the molecular weight of the lower constituent cannot be calculated. The presence of material of molecular weight

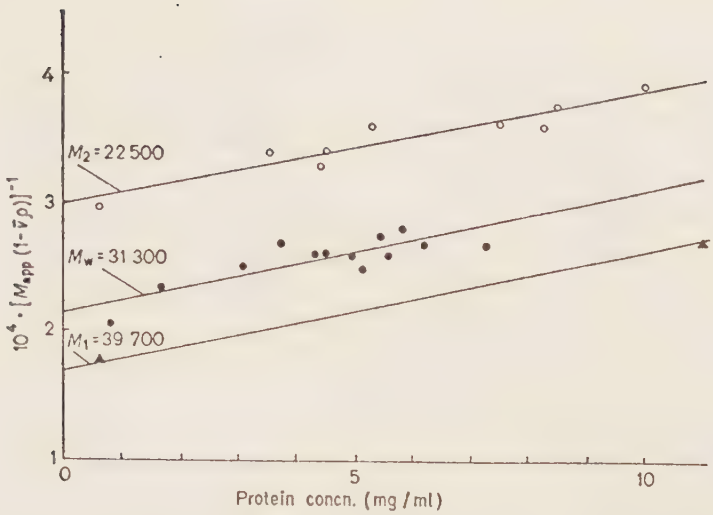


Fig.4. *Influence of the protein concentration on the apparent molecular weight in 6 M guanidine-HCl, 0.1 M 2-mercaptoethanol medium at 20 °C.* All the apparent molecular weights were normalized to the same conditions: 6 M guanidine-HCl, and 20 °C. ○, apparent molecular weight of the light chain; ●, apparent weight-average molecular weight of the light and heavy chains of cytochrome b_2; ▲, apparent molecular weight of the heavy chain observed by molecular sieving and by equilibrium centrifugation

lower than 10000 (never observed with untreated samples) was detected, suggesting that some degradation occurs during the carboxymethylation.

In order to interpret all these experiments, we had to extrapolate the different apparent molecular weight values to zero protein concentration. It is known indeed that in concentrated guanidine-HCl solutions, the observed molecular weights are strongly dependent on the protein concentration. We thus normalized all our $M_{(app)}$ data to the same conditions: 6 M guanidine-HCl and 20 °C, using the formula:

$$M_{(app)}(1-\bar{v}\rho)_{6\text{ M},\,20\,^\circ\text{C}} = (s/D)_{6\text{ M},\,20\,^\circ\text{C}}\,(RT)_{20\,^\circ\text{C}} = \frac{(s/D)'(RT)'(1-\bar{v}\rho)_{6\text{ M},\,20\,^\circ\text{C}}}{(1-\bar{v}\rho)'}.$$

Fig.4 shows the diagram obtained by plotting the normalized $1/M_{w\,(app)\,1,2}(1-\bar{v}\rho)$ and $1/M_{(app)2}(1-\bar{v}\rho)$ values *vs* protein concentration, where $M_{(app)2}$ is the apparent molecular weight of the light chain. Fitting the experimental points to straight lines according to the least squares method results in the following equations:

$$\frac{10^4}{M_{(app)\,1,2}(1-\bar{v}\rho)} = 0.098\,c + 2.1437$$

and

$$\frac{10^4}{M_{(app)\,2}(1-\bar{v}\rho)} = 0.093\,c + 2.970$$

(where c is the protein concentration in mg/ml.)

It should be emphasized that the slopes of these lines are virtually the same, and are identical to those obtained by Ullman *et al.* [18] for six proteins in 6 M guanidine-HCl. The extrapolation to zero protein

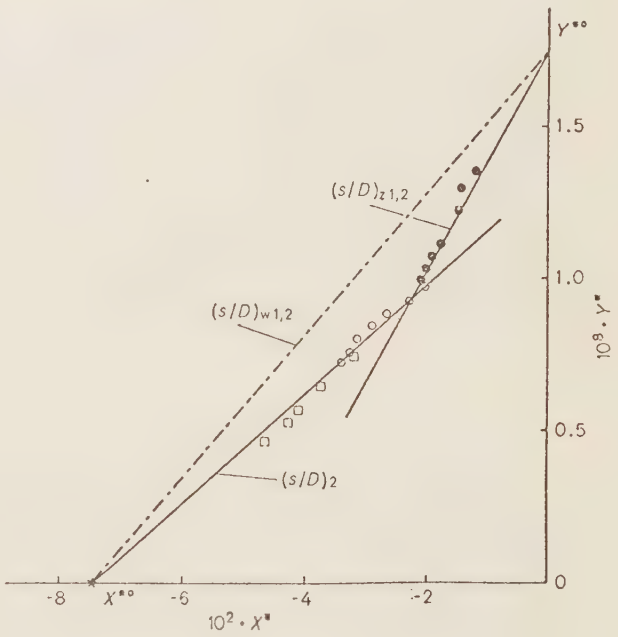


Fig.5. *Approach-to-equilibrium centrifugation : molecular weight of the subunits of cytochrome* b_2 *in 3 M guanidine (Erlander and Foster diagram).* The plot is analysed as two straight lines and yields an apparent molecular weight of the light chain $M_{(app)_2} = 19700$, an apparent weight-average molecular weight $M_w = 26000$ and an apparent "Z-average" molecular weight $M_{z\,(app)} = 40000$. The solution of cytochrome b_2 dialysed for 36 h against 0.1 M phosphate, 20 μM EDTA buffer pH 7.2 containing 3 M guanidine-HCl and 0.1 M 2-mercaptoethanol at 4 °C was then diluted to 4 mg/ml with the same dialysis buffer. The protein solution was centrifuged as described in Fig.3. ●, 23150 rev./min; ○, 31410 rev./min; □, 42040 rev./min; ✳, 59780 rev./min

concentration gives $M_{w\,1,2} = 31300 \pm 2000$ and $M_2 = 22600 \pm 1500$, taking $\bar{v} = 0.74$ cm³/g (with $\bar{v} = 0.73$ cm³/g, we would obtain $M_2 = 21000$). The apparent molecular weight values of the heavy chain, $M_{(app)\,1}$, were calculated, according to Erlander and Foster [14] from the $M_{w\,(app)\,1,2}$, $M_{z\,(app)\,1,2}$ and $M_{(app)2}$ values. They ranged from 35000 to 41000.

Studies of the Heavy Chain Resolved by Molecular Sieving

After gel filtration of cytochrome b_2 through Sephadex G-100 equilibrated with a phosphate buffer containing 3 M guanidine-HCl and 0.1 M 2-mercaptoethanol we partially separated two constituents (Fig. 6). The front and the terminal fractions were collected separately, concentrated and used for the approach-to-equilibrium measurements. The light fraction exhibited a complex diagram from which the $M_{(app)2}$ value was approximately estimated as 18200. The front heavy fraction exhibited a linear diagram suggesting homogeneity. The calculated $M_{w\,(app)}$ of this heavy fraction and the $M_{(app)1}$ value of the equilibrium run in 4 M guanidine-HCl medium gave $M_1 = 39700 \pm 3000$ by extrapolation to zero protein concentration using the same slope as above.

Further Characterization of the Chains by Heme and FMN Rebinding

In preliminary experiments, after a partial fractionation of the light and heavy chains by molecular sieving in 2 M guanidine-HCl, having lost the heme and FMN groups, we tested on each fraction the rebinding of the prosthetic groups. The fractions were renaturated, according to Forestier and Baudras [19], by dialysis against a 0.15 M phosphate, 20 µM EDTA buffer, pH 7.2 containing 50 mM lactate, and 0.1 M 2-mercaptoethanol. The heme rebinding was spectrophotometrically followed [20]. It was shown that the heavy component, collected in front fractions deprived of the light one, did rebind heme nearly stoichiometrically (90%). In terminal fractions, we obtained a mixture of the heavy and light components (0.8 mole of light chain per 0.2 mole of heavy chain, as tested by an electrophoresis in sodium dodecylsulfate on polyacrylamide gel). This mixture rebound only a fraction of heme in agreement with the heavy chain content.

The FMN rebinding was fluorometrically followed. The front fractions, devoid of the light component, did not rebind any FMN. On the contrary, terminal fractions bound a certain amount of flavin (0.2 mole per mole of light chain). The analysis carried out on each fraction (ultraviolet spectrum, concentration of rebounded heme and flavin, concentration of tryptophan) were consistent with the assumption that the FMN is bound on the light chain.

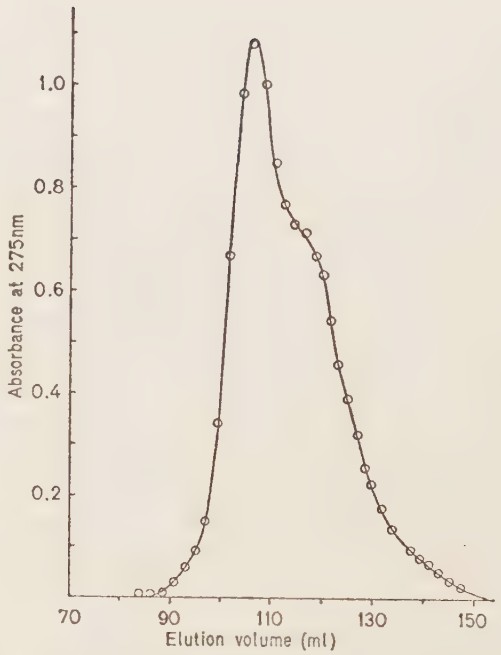


Fig. 6. *Fractionation by gel filtration through Sephadex G-100 of the chains of cytochrome* b_2 *dissociated in guanidine.* 1 ml of a solution of cytochrome b_2 (36 mg/ml) was dialyzed for 1 h at 25 °C against 0.1 M phosphate 20 µM EDTA buffer pH 7.2 containing 6 M guanidine-HCl and 0.1 M 2-mercaptoethanol. This solution was then applied on a Sephadex G-200 column (2.5×45 cm) equilibrated and developed at 25 °C with 0.1 M phosphate, 20 µM EDTA buffer pH 7.2 containing 3 M guanidine-HCl and 0.1 M 2-mercaptoethanol. The flow rate was 8 ml/h and fractions of 1.0—2.0 ml were collected. The front fractions and terminal fractions (corresponding to elution volume 90—102 ml and 120—135 ml, respectively) were pooled and concentrated separately for approach-to-equilibrium measurements)

DISCUSSION

For many years, thanks to pioneering works in Morton's laboratory, the best estimate of the molecular weight of cytochrome b_2 obtained through ultracentrifugation experiments, was 183400 [21]. It was the apparent average value of data ranging from 130000 to 250000. The partial specific volume used for the calculations was 0.71 cm³/g [22]. Adopting the value of $\bar{v} = 0.744$ cm³/g at 4 °C, estimated from the determinated value 0.754 cm³/g at 25 °C [4], this approximate apparent molecular weight should be corrected to 200000—210000.

From a recent X-ray diffraction study by the powder technique on two crystalline forms of cytochrome b_2 [4], a molecular weight of $n \times (117300 \pm 4000)$ was found, with n equal to 1, 2 or 4. The choice $n = 2$, giving $M_r = 234600 \pm 8000$ appeared as the only one which would lead to a result consistent with the previous hydrodynamic measurements of the molecular weight. On the other hand, the technique provided a "true" molecular weight and not some sort of average. This value is in close agreement

with the one we reported here. Using the Yphantis equilibrium ultracentrifugation method we found 240000 ± 10000 as compared to 234600 ± 8000. The symmetry of the crystals implied that the molecule is composed of at least two or possibly four identical parts. Moreover, analytical data showed that the molecular weight corresponding to one set of prosthetic groups (heme and flavin) is 58600 [6]. These results suggest that the whole molecule is a true or a pseudotetramer, each monomer bearing one heme and one flavin.

The aim of our work was to determine the number of polypeptide chains of cytochrome b_2 in each monomer, and their molecular weights. In early preliminary studies at low guanidine concentration, Baudras and Labeyrie [7] detected subunits of apparent molecular weight 34000 and 17000, but whether or not the heavier subunit was fully dissociated was not established.

We first used solvent conditions considered to be fully dissociating: 6 M guanidine-HCl, 0.1 M 2-mercaptoethanol [17]. The weight-average molecular weight of the chains we found was $M_w = 31300 \pm 2000$, after extrapolation to zero protein concentration. This result demonstrates that each monomer "58600" is made up of two chains. From these experiments, the molecular weight of a lower constituent could not be calculated. However, when the viscosity of the medium is reduced (we used 2—3 M guanidine-HCl instead of 6 M) the paucidispersity of the cytochrome b_2 solutions clearly appears. The diagrams are characteristic of a two-component system. Our results together with those obtained by Baudras allowed us to calculate the molecular weight of the light component; $M_2 = 22600 \pm 1500$. From this, the molecular weight of the heavier component can be deduced, thus: 58600—22600 = 36000. This value is in good agreement with the $M_{(app)1}$ values calculated from experiments in 2—4 M guanidine-HCl, ranging from 35000 to 41000. A better estimate was obtained by using fractions practically deprived of the light constituent, obtained following molecular sieving of a 2 M guanidine-HCl solution of the enzyme: $M_1 = 39700 \pm 3000$.

It is interesting to note that, as shown by these results, the enzyme was fully dissociated at guanidine concentrations as low as 2 M. On the other hand it should be pointed out that a 6 M guanidine medium was not suitable for the resolution of a paucidisperse mixture of constituents of M_r 20000 and 40000.

While this work was in progress, a study giving the same conclusions was carried out by Lederer and Simon [23]. They separated the chains by molecular sieving following carboxymethylation, estimated their molecular weights from dodecylsulfate disc gel electrophoresis experiments and gave the amino acid composition of the chains. They found that the apparent molecular weights of the subunits were about 36000 and 21000.

The fact that cytochrome b_2 contains two kinds of prosthetic groups, suggests that it may be the association of a flavoprotein subunit with a cytochromic subunit. Since it is now demonstrated that each protomer is formed by two kinds of chains, the localisation of the prosthetic groups on each chain was the aim of further analyses. Several indirect arguments were given [23,24] which suggested that the heme group is bound to the heavier chain. Concerning the flavin group nothing was known. Having successfully obtained a partial fractionation of the light and heavy chains in 2 M guanidine-HCl by molecular sieving, we observed selective binding of each group on the fractions. After a renaturing treatment of the fractions, we obtained a stoichiometric rebinding of protoheme on the heavy component (front fractions). As far as FMN rebinding is concerned, our preliminary results are consistent with the binding site being on the light component. Experiments are in progress in order to obtain a complete separation of the chains.

It is not known at present if the two chains of the monomer unit are bound or not by disulfide bridges, and how large their interactions are in the whole polymeric structure. However, these interactions are certainly much smaller than the interactions between the monomers. Indeed, even under mild dissociation conditions the unit 58600 is never observed, and the dissociation gives directly the smaller 20000 and 40000 polypeptide chains.

Very recently, this "two chains per monomer" structure for crystallized cytochrome b_2 was shown to result from a proteolytic cleavage [25,26]. Actually a "one chain per monomer" structure is found in the cytochrome b_2 of *Hansenula anomala*, and in the non-crystallized preparations of cytochrome b_2 of *Saccharomyces cerevisiae*.

The study presented here leads to a rough image of the quaternary structure of cytochrome b_2. This molecule can be depicted as consisting of eight chains, four of which carry a heme and the four others probably carrying an FMN. Each pair of a heavy and a light component, associated either by disulfide bridges or other means, constitutes a subunit of M_r 58600. Finally, four of these subunits associate to make the tetrameric enzyme.

I wish to thank Dr F. Labeyrie in whose laboratory this work was carried out, for many helpful criticisms and discussions. Thanks are also due to Dr S. Filitti-Wurmser for her interest and many valuable discussions. We are grateful to Dr A. Baudras for having given his results at low guanidine concentration, to Mrs M. Desmerger, S. Laroche and J. Lefeuvre for their assistance in ultracentrifugation studies by the approach-to-equilibrium method. This work has been supported in part by a grant from the *Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique, Comité de Biologie Moléculaire.*

REFERENCES

1. Groudinsky, O., Jacq, C., Labeyrie, F., Lederer, F., Monteilhet, C., Ninio, M., Pajot, P., and Risler, J. L., in *Flavins and Flavoproteins* (edited by H. Kamin) University Park Press, Baltimore 1971, p. 581.
2. Appleby, C. A., and Morton, R. K., *Nature (London)*, 173 (1954) 749.
3. Appleby, C. A., and Morton, R. K., *Biochem. J.* 73 (1959) 539.
4. Monteilhet, C., and Risler, J. L., *Eur. J. Biochem.* 12 (1970) 165.
5. Jacq, C., and Lederer, F., *Eur. J. Biochem.* 12 (1970) 154.
6. Pajot, P., and Groudinsky, O., *Eur. J. Biochem.* 12 (1970) 158.
7. Baudras, A., and Labeyrie, F., in *Structure and Function of Cytochromes* (edited by K. Okunuki, M. Kamen, I. Sekuzu) University Park Press, Baltimore 1968, p. 601.
8. Appleby, C. A., and Morton, R. K., *Biochem. J.* 71 (1959) 492.
9. Spyridakis, A., Naslin, L., and Labeyrie, F., *Biochimie*, 53 (1971) 195.
10. Crestfield, A. M., Moore, S., and Stein, W. H., *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 622.
11. Yphantis, D. A., *Biochemistry*, 3 (1964) 297.
12. Labar, F. E., *Biochemistry*, 5 (1965) 2368.
13. Klainer, S. M., and Kegeles, J., *J. Phys. Chem.* 59 (1955) 952.
14. Erlander, S. R., and Foster, J. F., *J. Polymer Sci.* 37 (1959) 103.
15. Kielley, W. W., and Harrington, W. F., *Biochim. Biophys. Acta*, 41 (1960) 401.
16. Taylor, J. F., and Lowry, C., *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 109.
17. Tanford, C., Kawahara, K., *J. Amer. Chem. Soc.* 89 (1967) 729.
18. Ullman, A., Goldberg, M. E., Perrin, D., and Monod, J., *Biochemistry*, 7 (1968) 261.
19. Forestier, J. P., and Baudras, A., in *Flavins and Flavoproteins* (edited by H. Kamin) University Park Press, Baltimore 1971, p. 599.
20. Mével-Ninio, M., Pajot, P., and Labeyrie, F., *Biochimie*, 53 (1971) 35.
21. Armstrong, J. Mc D., Coates, J. H., and Morton, R. K., *Biochem. J.* 86 (1963) 136.
22. Appleby, C. A., Morton, R. K., and Simmonds, D. H., *Biochem. J.* 75 (1960) 72.
23. Lederer, F., and Simon, A. M., *Eur. J. Biochem.* 20 (1971) 469.
24. Baudras, A., unpublished results.
25. Jacq, C., and Lederer, F., *Eur. J. Biochem.* 25 (1972) 41.
26. Labeyrie, F., and Baudras, A., *Eur. J. Biochem.* 25 (1972) 33.

M. Mével-Ninio
Laboratoire de Génétique Moléculaire du C.N.R.S.
F-91 Gif-sur-Yvette, France

C H A P I T R E I I

DISSOCIATION DES GROUPEMENTS PROSTHETIQUES DU FLAVOCYTOCHROME b_2 :

A - RECONSTITUTION DE L'HEMOPROTEINE (DEFLAVOCYTOCHROME b_2)

Les équipes travaillant sur le flavocytochrome b_2 ont tenté depuis de nombreuses années de fabriquer des dérivés qui seraient dépourvus de l'un ou l'autre des groupes prosthétiques, flavine ou hème. En effet des études cinétiques sur ces dérivés pouvaient apporter des renseignements sur le rôle de chacun des groupes prosthétiques dans le passage des électrons du donneur, le L-lactate à différents accepteurs, cytochrome c ou ferricyanure. Des études spectrales pouvaient également mettre en évidence des interactions entre ces deux groupements.

Chaque fois qu'il n'est pas fixé covalemment, la dissociation de l'hème de la protéine est une propriété commune à de nombreuses hémoprotéines (54-56). Cependant pour le flavocytochrome b_2 jusqu'alors cette dissociation s'était avérée très difficile à réaliser parce que les traitements classiques de précipitation à l'acétone acide provoquaient une dénaturation irréversible de la protéine (3 % seulement de l'activité pouvait être reconstituée (57)) Ceci était attribué au poids moléculaire élevé et à la complexité de la protéine.

Aussi a-t-il été extrêmement interessant d'observer que l'hème se détachait de la partie protéique par traitement par la guanidine 6 M. Nous avons montré qu'il se refixait par simple dilution (x 10) de la guanidine 6M, redonnant le spectre caractéristique de l'hème fixé, avec un pic à 413 nm (forme oxydée), la hauteur de ce pic étant 95 % de celle du départ.

Nous avons pu obtenir un dérivé "apoprotéine" dépourvu à la fois d'hème et de flavine. Nous avons montré que cette apoprotéine pouvait refixer du protohème quantitativement, le rendement de fixation étant proche de 100 %.

Cette "apoprotéine" peut être soumise à un traitement renaturant en présence de protohème et de FMN. Après une dialyse de 5 jours

au cours de laquelle la guanidine est éliminée,et qui permet aux chaines polypeptidiques de reprendre une conformation proche de l'état natif, on récupère une protéine qui sédimente comme un composé homogène avec la même vitesse de sédimentation que le flavocytochrome b_2 initial. Ce produit, de plus, a une activité molaire par FMN qui est 50 % celle du flavocytochrome b_2 d'origine. Ces résultats sont rapportés dans l'article ci-joint.

Nous avons pu obtenir des renseignements spectraux sur l'apoprotéine d'une part, sur l'hème fixé à la protéine d'autre part.

Signalons que cette apoprotéine est devenue un instrument de travail classique dans le laboratoire, et a fait l'objet ultérieurement d'un certain nombre d'études. En particulier J.L. Risler (35) et moi même l'avons utilisée pour étudier les positions respectives des 2 groupements prosthétiques hème et flavine.

BIOCHIMIE — Extrait du Tome 53, n° 1, 1971, p. 35.

Printed in France.

Reconstitution of cytochrome b_2 following prosthetic groups dissociation by guanidine hydrochloride, Protoheme binding,

par Maryvonne Mevel-Ninio, Patrick Pajot, Françoise Labeyrie.

Centre de Génétique Moléculaire du C.N.R.S., 91 - Gif-sur-Yvette - France.

Summary. — The heme and flavin prosthetic groups of cytochrome b_2 (L-lactate cytochrome c oxidoreductase), a tetrameric enzyme, were dissociated by a 6 M guanidine hydrochloride treatment.

A hemoprotein was quantitatively reconstituted from the apoprotein and protohematin with restauration of the original hemochromophore. The recombination occurs regardless of the polymeric state of the apoprotein.

An enzymically active tetramer was recovered after incubation of the apoprotein with both FMN and hemin.

Cytochrome b_2 (yeast L-lactate cytochrome c oxidoreductase) is an enzyme of molecular weight 235 000 [1], which presents the unusual property of containing both heme and FMN (*) as prosthetic groups [2, 3.] In order to collect information about the functional role of these groups, several attempts to prepare heme- or flavin- free derivatives were made.

Using a classical acid ammonium sulfate treatment, a deflavo derivative can easily be prepared. Morton [4] and independently Baudras [5] in this laboratory have shown that the enzymic activity can be restored by addition of FMN to that derivative ; a further crystallisation of the reconstituted enzyme allowed Baudras to recover about 80 p. 100 of the original specific activity [6]. Studies of this deflavo-cytochrome b_2, which cannot be reduced by L-lactate and is devoid of activity, demonstrated the important role played by the flavin moiety in the catalytic process [6].

The dissociation of the heme group was considered most difficult to achieve without an extensive denaturation of the protein [4]. Nevertheless, Morton and Shepley [7] have shown that a hemochrome spectrum can be restored when hemin is added to an apoprotein preparation obtained by an acid acetone treatment of the holoenzyme ; very little activity (0.6 - 1 p. 100) could be regained after an incubation in the presence of both hemin and FMN. However, a detailed study of the apoprotein and its interactions with the prosthetic groups was not undertaken.

An approach to this problem was to investigate the reconstitution of a derivative of cytochrome b_2 of low molecular weight resulting from a proteolysis [8 - 10] which has no enzymic activity although it can be used as an acceptor, instead of cytochrome c, in the oxidation of L-lactate catalysed by cytochrome b_2 [11].

While studying the dissociation of the enzyme into sub-units by a treatment with guanidine hydrochloride [12], we found conditions enabling the heme group to be separated out in a reversible manner. The object of the present paper is to describe the preparation of an « apo »-cytochrome b_2 devoid of both its heme and flavin prosthetic groups ; some of its physico-chemical and spectral properties are reported as well as those of the reconstituted hemoprotein.

Methods.

The guanidine HCl used in this study was purchased from Carlo Erba, and the 2-mercaptoethanol from Fluka. The phosphate buffer used throughout the experiments was a monopotassic-disodic buffer ; the total phosphate concentration is given in each particular case.

Cytochrome b_2 (type II) was prepared according to Appleby and Morton [13] with the modi-

(*) Abbreviations : FMN : flavin mononucleotide ; EDTA : ethylene diamine tetracetic acid.

fications proposed by Spyridakis et al. [14]. The enzyme was kept at 0° as an ammonium sulfate precipitate. Enzyme concentration was determined at neutral pH, using the values $\varepsilon = 183$ mM^{-1} cm^{-1} for the γ-band of the reduced enzyme or 129 for the corresponding peak of the oxidized material [15].

Enzyme activity was estimated according to Baudras [6].

Hematin or hemin chloride was obtained commercially (Calbiochem) or collected as a by-product of the preparation of the cytochrome b_2 apoprotein. The solutions were prepared by dissolving a few crystals in one drop of 0.1 N NaOH and diluting with water ; they were used within a few hours. The concentration of the solution was determined in 0.1 N NaOH by the absorbance at 385 nm in a Cary model 15 spectrophotometer using $\varepsilon = 60.3$ mM^{-1} cm^{-1}, a value consistent with the quite generally accepted one $\varepsilon = 11.1$ mM^{-1} cm^{-1} in KCN at 545 nm [9].

To compare the protein concentrations in the presence of other substances absorbing in the ultraviolet region, we used the fluorescence of tryptophanyl residues of the protein denatured in 6-7 M guanidine hydrochloride in the presence of 1 p. 1 000 2-mercaptoethanol. An internal calibration by addition of a known amount of tryptophan allowed one to refer to protein concentration expressed in « tryptophan fluorescence arbitrary units », a method which is likely to be rigorous for comparing amounts of identical polypeptide chains (*). A spectrofluorimeter built by M. Iwatsubo and described elsewhere [16] was used. The excitation wavelength of 295 nm was chosen in order to excite only the tryptophanyl residues.

The sedimentation experiments were carried out in a Beckman Spinco model E analytical ultracentrifuge equipped with ultraviolet optics and temperature control unit. We used the band centrifugation method which physically separates components of different sedimentation velocity. The blackening of the films was read with an automatic recording microdensitometer (Joyce-Loebl model Mk III c). Apparent sedimentation coefficients were calculated by the usual procedures and corrected to standard conditions.

The solvent viscosity was measured with an Ubbelohde viscosimeter (flow time with water at 22°, 180 sec) and the densities in a precision digital densimeter (Parr, Gratz, Austria).

(*) This method is based on the assumption that the tryptophanyl fluorescence of denatured proteins is normalized. With a number of proteins, it has been verified that this fluorescence is identical to that of the free aminoacid under the specified conditions and at pH 7 (Pajot and Labeyrie, unpublished results).

Results.

Preparation of the apoprotein.

The apoprotein is obtained by two different methods. The first one consists of dissociating the prosthetic groups by a treatment with guanidine hydrochloride, the second one is an acid-acetone procedure.

The first preparative method is as follows : Crystals of cytochrome b_2 are dissolved in a solution of 0.1 M phosphate, pH 7.2, containing 6 M guanidine HCl, 20 μM EDTA, 0.1 M 2-mercaptoethanol at a protein concentration of about 15 mg/ml. This has been then dialyzed against the same solution for two to three hours at room temperature. The protoheme dissociated from the protein crystallizes and is removed by centrifugation at 27 000 × g ; this protoheme is used (following one washing with distilled water) in recombination experiments. In order to remove guanidine HCl and 2-mercaptoethanol, the apoprotein preparation is first diluted to a protein concentration of about 2.5 mg/ml (which prevents precipitation) and anaerobically dialyzed for 18 hours against a 0.15 M phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.15 M NaCl and 20 μM EDTA. In a few recombination experiments this second dialysis is omitted ; the apoprotein solution in 6 M guanidine HCl is then only diluted five or six fold with phosphate buffer and the slight amount of insoluble material eliminated by centrifugation (27 000 × g for 10 minutes).

The second method used is the classical acid-acetone treatment which has been successfully employed previously with the cytochrome b_2 core [9]. The procedure consists of injecting the dilute protein solution as a fine jet into 1 p. 1 000 HCl-acetone kept at — 10° ; the white precipitate that is collected is dissolved in a buffer containing 3 M guanidine and 5 p. 100 2-mercaptoethanol. This is followed by dialysis for two days against several changes of 0.05 M phosphate buffer (pH 7) with 0.5 M NaCl. Such an operating procedure yields very little insoluble material and a good « renaturation » of an apoprotein containing less than 5 p. 100 residual heme. The solubility of the apoprotein is low in buffer at ionic strength below 0.2.

Spectral characteristics of the apoprotein.

By using one of the methods described above, one can obtain protein material containing less

than 2 p. 100 residual heme and no flavin. Its absorption maximum lies at 278 nm. A good purity index is the ratio of the absorbances at the maximum (278 nm) and the minimum (250 nm) which reaches 2.5. A slight turbidity is sometimes observed, but can be usually prevented by using a high ionic strength buffer (I = 0.4 - 0.7) or a low concentration of guanidine hydrochloride (1 M).

The extinction coefficient of the apoprotein was estimated from the ratio of the absorbance and the protein concentration measured by the fluorometric method described above : $\varepsilon_{278} = 48.1$ mM^{-1} cm^{-1} (σ = 2.8, 19 values).

The ratio of the number of tyrosine and tryptophan residues was estimated according to Edelhoch [17] and found to be 3.4 ; if there are 16 tyrosines residues per 58 000 daltons [18], the monomeric unit bearing one heme contains 4.7 tryptophans.

Reconstitution of the cytochrome b_2 hemochromophore.

The reversibility of the heme protein dissociation was shown by adding cytochrome b_2 to a concentrated guanidine hydrochloride solution and subsequently diluting (× 10) this solution.

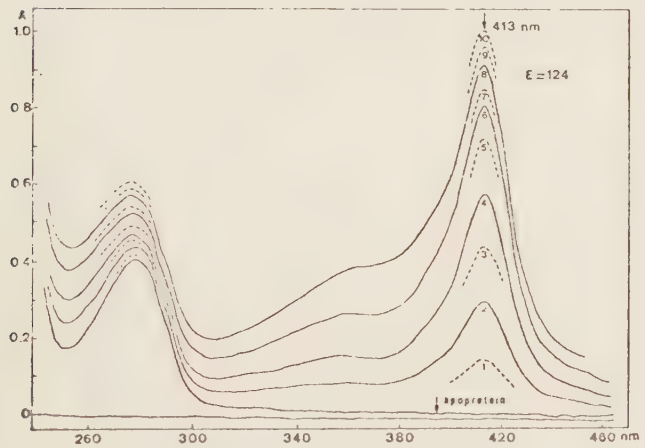


Fig. 1. — Absorption spectra following successive heme additions to the cytochrome b_2 apoprotein.

800 µl of a 8.6 µM apoprotein solution (prepared by the 6 M guanidine HCl treatment and dialysed for 18 hours at 4° against a 0.15 M phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.15 M NaCl and 20 µM EDTA) are placed in a spectrophotometric cell (l = 1 cm) at 28°. Each heme addition (10 µl) corresponds to 1.18 µM.

The characteristic visible spectrum, strongly modified in guanidine, was recovered and the peak heights corresponded to 95 p. 100 of those of a control sample.

Titration experiments were carried out by adding aliquots (10-15 µl) of a fresh hematin solution to 0.9-1 ml of buffer containing 3-4 nanomoles of apoprotein. After stabilization of the absorbance (15 - 20 minutes are generally required at 20°) the spectrum was recorded (Fig. 1). The increase of absorbance at 413 nm was plotted against the

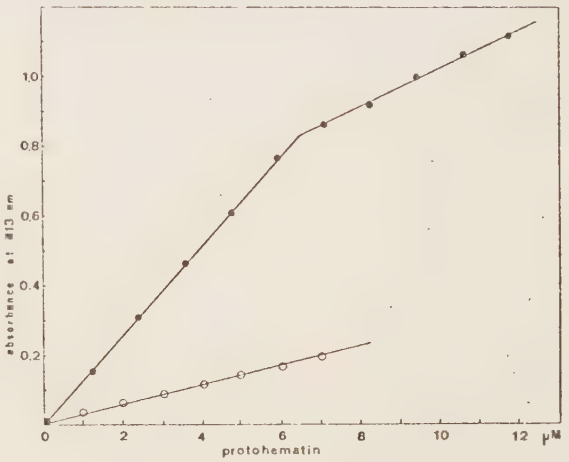


Fig. 2. — Spectrophotometric titration curves of the apoprotein with protohematin.

Data were reported from Fig. 1. Upper curve (●—●) : absorbance at 413 nm of hematin added to the apoprotein solution (the initial slope giving the ε value of the bound heme). Lower curve (○—○) : absorbance at 413 nm of hematin in the same buffer.

consists of two straight line portions. The first one represents the specific association of heme with the apoprotein and the second one the cumulative absorptions of free and unspecifically bound hemin. The values of the Soret extinction coeffi-

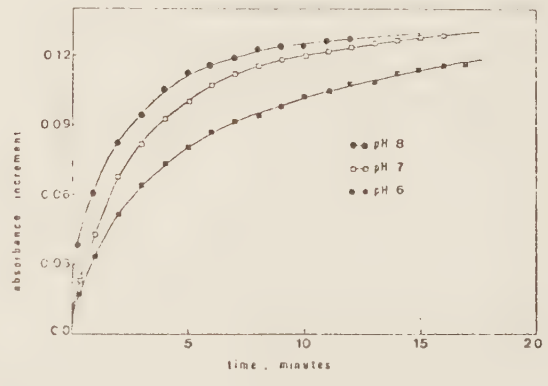


Fig. 3. — Kinetics of heme binding to the apoprotein :

1 ml of a 3.3 µM apoprotein solution (prepared by the acid-acetone treatment) is placed in a spectrophotometric cell to which one added at time zero 1.1 µM hematin (in a solution of 0.05 M phosphate at pH 8, 7 or 6 containing 0.5 M NaCl at 21°).

hematin concentration ; the titration curve (Fig. 2) cient of the oxidized hemochromophore range from 105 - 127. The mean value of 17 experiments is 117 mM^{-1} cm^{-1} (σ = 6), in excellent agreement with the absorptivity of the deflavocytochrome b_2.

The rate of recombination is faster at higher pH, as shown on Fig. 3, it also increases markedly with temperature, suggesting that extensive conformational changes occur concommitantly.

Following dithionite reduction, the reconstituted hemoprotein shows absorption maxima at the same wavelengths as those of the initial holoenzyme. The ratio of the reduced over oxidized Soret peak intensities is 1.5, as can be deduced for the deflavo-cytochrome b_2 from the cytochrome b_2 spectrum and the contributions of the oxidized and reduced FMN at 424 and 413 nm respectively (183 - 3.5)/(129 - 10).

Such reconstitution experiments provide also means for drawing the spectrum of the heme chromophore in the ultraviolet region, (Fig. 4) assuming that the protein aromatic chromophores are not perturbed by the heme binding. The main features resemble those of the cytochrome c hemochromophore spectrum published by URRY [19].

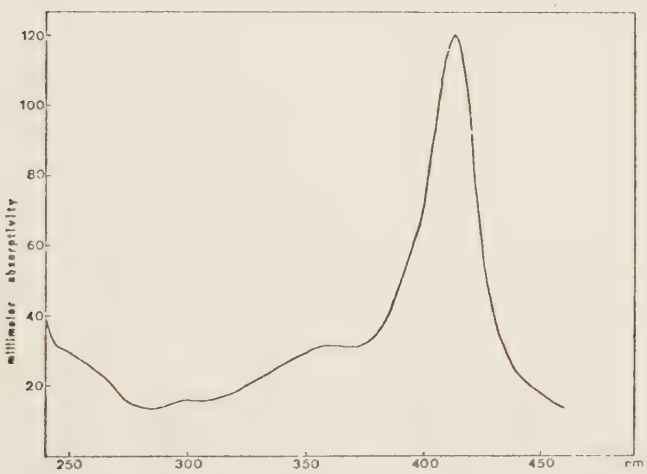


FIG. 4. — Spectrum of the cytochrome b_2 hemochromophore in the ultra-violet region.

Spectra of (1) an apoprotein solution (cf. fig. 1) and (2) the same solution after addition of a substoichiometric amount of hematin are recorded (Cary 15). The apoprotein contribution, corrected for dilution, is substracted from the second spectrum. Millimolar absorptivity (ε) is calculated assuming 120 mM^{-1} cm^{-1} for the absorbance of the bound heme at 413 nm. It is assumed that heme binding does not alter the UV spectrum of the aromatic residues of the apoprotein.

When the heme, just released from cytochrome b_2 itself, is recombined with the apoprotein, one obtains exactly the same spectrum as that observed when commercial hemin chloride is employed.

The fixation of the protoheme was also followed with the fluorometric titration method developed in studies of cytochrome b_2 core [9]. The fluorescence of the apoprotein (excited at 295 nm) is quenched upon heme binding to about 70 p. 100. The end-point of the fluorometric titration is the same as that observed with the optical absorption method (Fig. 5).

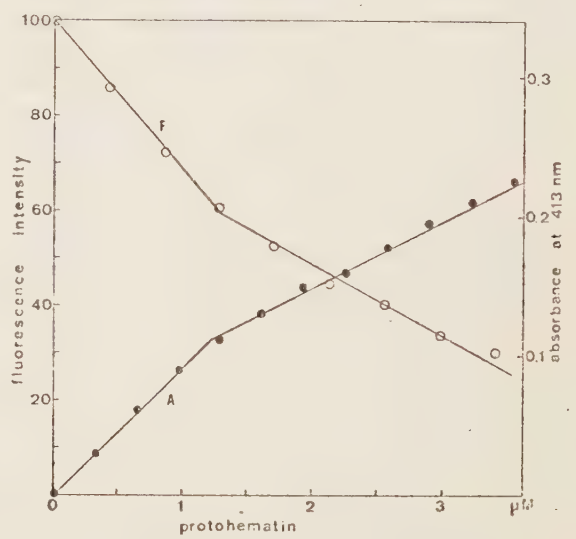


FIG. 5. — Titration curves of the cytochrome b_2 apoprotein with hemin as observed by spectrophotometric and fluorometric measurements.

1 ml of a 1.41 µM apoprotein solution (prepared by the 6 M guanidine HCl treatment) is placed in a spectro-fluorometric cell (1 × 0.4 cm). Aliquots of hemin are added (cf. Fig. 1). Absorbances at 413 nm (A) and fluorescence intensity (F) (excited at 295 nm and measured at 360 nm) are measured after each addition. Corrections are made for dilution and for the decrease of the excitation intensity resulting from the heme absorption : to this end a parallel experiment with hemin added to free tryptophan was carried out.

Stoichiometry of the recombination.

If the apoprotein concentrations are measured by their tryptophan content estimated by means of the fluorometric method described in a preceding section, the amount of hematin at the equivalent point in the titration gives the number of heme binding sites. It is found in the best cases one heme site per 5 tryptophans of the apoprotein, the same number that is found in cytochrome b_2.

The yield of apoprotein able to fix hemin depends upon the treatment applied to it. Close to 100 p. 100 when the apoprotein has just been pre-

pared, it becomes about 80 p. 100 after a three-day dialysis against an aqueous buffer.

Polymeric state of the apoprotein.

It was also of interest to see whether the apoprotein freed of both its prosthetic groups had the same polymeric structure as the native enzyme. Cytochrome b_2 is a tetramer of 235 000 daltons [1] which is dissociated into smaller fragments by denaturing agents [12, 21].

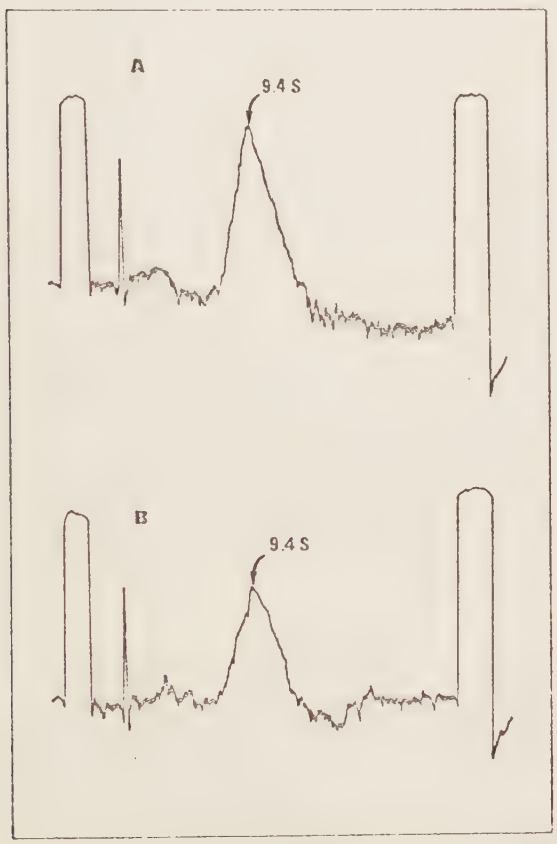
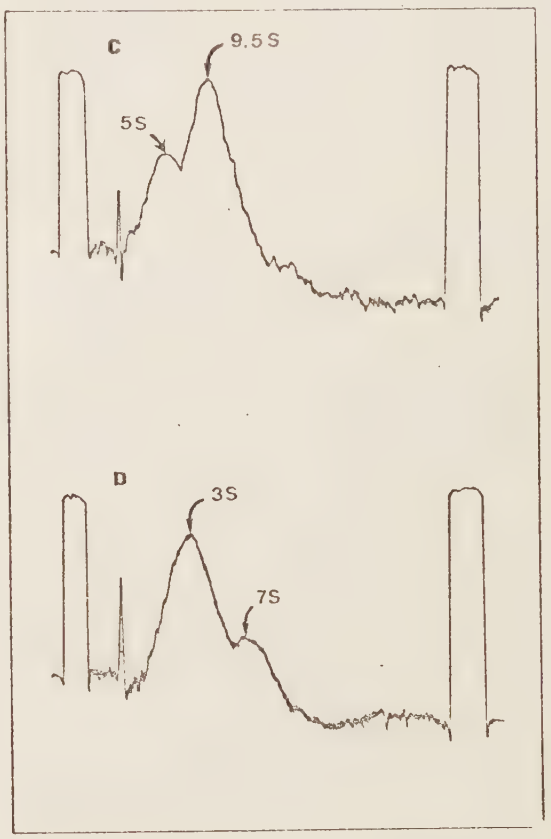


FIG. 6. — Sedimentation studies of the apoprotein, as compared with cytochrome b_2 and reconstituted cytochrome b_2.

50 µl of protein solution (1 mg/ml) in 0.15 M phosphate, 0.15 M NaCl buffer (pH 7.2) are layered on a 0.15 M phosphate, 0.8 M NaCl buffer solution (pH 7.2).

A : Cytochrome b_2 (60,000 rpm — 41 minutes after full speed, at 8°).

B : Reactivated cytochrome b_2 (60,000 rpm — 41 minutes after full speed, at 8°). The sample results from a prolonged dialysis of the apoprotein of cytochrome b_2 (same sample as below) with three fold excesses of FMN and hematin in the presence of lactate and 2-mercaptoethanol.



C : Apoprotein of cytochrome b_2 (obtained by the 6 M guanidine HCl treatment and dialyzed for 18 hours at 4° against a 0.15 M phosphate buffer containing 0.15 M NaCl and 20 µM EDTA). (60,000 rpm — 31 minutes after full speed at 8°).

D : Reconstituted deflavocytochrome b_2 (hemoprotein). The apoprotein of cytochrome b_2 (same sample as above) is titrated with hematin and dialyzed as above, ie without lactate and 2 Mercaptoethanol. (60,000 rpm — 57 minutes after full speed, at 8°).

The indicated sedimentation coefficients are corrected to standard conditions (at 20°).

Ultracentrifugation runs were carried out in order to compare the « holo » enzyme, the apoprotein (dialysed against 0.15 M phosphate (pH 7.2) 0.15 M NaCl) with the reconstituted hemoprotein (dialysed against the same buffer). The sedimentation patterns are shown in Fig. 6 a and 6 b.

The apoprotein preparation as well as the reconstituted hemoprotein behave as inhomogenous systems. The former gives band sedimentation patterns showing a major constituent ($S_{20,w}$ = 9.5), similar to that found for cytochrome b_2 in parallel runs ($S_{20,w}$ = 9.4), and a minor constituent ($S_{20,w}$ = 5) which probably corresponds to one half of the stable tetrameric molecule. The reconstituted hemoprotein also seems paucidisperse with a major peak ($S_{20,w}$ = 3) and a minor one ($S_{20,w}$ = 7). It has to be pointed out firstly

that the observed peaks may correspond to a mixture of different states of association, and secondly that the observed patterns may depend on the exact history of each preparation.

It can be concluded only that the heme binding and the polymerisation state appear to be independent. In other words the heme binding does not seem to provoke a marked reassociation of the protein.

Preliminary attempts at reconstitution of active cytochrome b_2.

A fresh preparation of apoprotein was incubated with three-fold excesses of hemin chloride and FMN and allowed to dialyse anaerobically for five days in the dark at 4°, against a 0.15 M phosphate buffer containing 25 mM L-lactate, 0.1 M 2-mercaptoethanol and 20 µM EDTA (pH 7.2). After such an extensive dialysis, a molar (ferricyanide) activity of 105 sec^{-1} was recovered, the molar activity of crystalline cytochrome b_2 is 230 sec^{-1} [14].

The same sample was submitted to ultracentrifugation and behaved exactly as cytochrome b_2, appearing as a homogenous band of $S_{20,w} = 9.4$; we thus observed that a « renaturation », conducted in the presence of 2-mercaptoethanol hemin FMN and L-lactate (the substrate which is known to protect the enzyme), allows one to yield a fairly active polymeric product.

Discussion.

The heme of cytochrome b_2 can be reversibly released, this is a common property of many other hemoproteins. For cytochrome b_2, the main difficulty in obtaining a soluble apoprotein that can bind stoichiometrically the heme probably results from the relatively high molecular weight and the complexity of the protein. If one uses the classical acidic acetone treatment, the precipitated protein is very often insoluble in ordinary buffer [4, 7] ; the clue for « renaturation » appears thus to be the solubilization of the precipitated material with the help of urea or guanidine in the presence of 2-mercaptoethanol. The original technique which was developed in this work, the dissociation of the enzyme by guanidine hydrochloride and 2-mercaptoethanol, seems to be an excellent alternative to acid ketone methods.

The material obtained by the latter procedure is practically free from heme and recombines with it with an excellent yield. This binding occurs whatever the state of association of the monomeric unit into dimer or tetramer. Such an observation could be anticipated since it has been shown that the apoprotein of cytochrome b_2 core (12 000 daltons) is able to bind heme with restoration of the initial cytochrome b_2 spectrum.

One difference from the low molecular weight proteolytic derivative is that, once the specific heme group is bound, extra heme can also be loosely attached to the protein with a markedly lower ε value. This was noticed by observing that the slope of the second portion of the titration curve is steeper than expected by comparison with a control experiment in which hemin is added to buffer [21]. This secondary heme group can be only partly eliminated by dialysis or gel filtration. A non-fonctional heme fixation is common protein owing to the particular structure of the porphyrin rings.

The ability of the apoprotein to reform the proper heme binding site is remarkable since it is not lost even after a treatment for two months with 6 M guanidine and 2-mercaptoethanol.

The titration curve presents a sharp break ; this means that the dissociation constant of the four heme groups is less than 10^{-8} M. The exact value was obtained by using a competition technique reported in another article [21].

The reconstitution of the spectral properties with commercial proto-hematin for the cytochrome b_2 itself as for the cytochrome b_2 core is interesting in that it provides a confirmation of the nature of this prosthetic group first identified by Appleby and Morton [2]. Furthermore, the titration of the apoprotein by hematin giving a value of $\varepsilon_{413\ nm} = 117\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ for the bound heme, in agreement with the one already determined for the cytochrome b_2 core [9] confirms the revised absorbance data given by Pajot and Groudinsky [15].

The reactivation of the enzyme following rebinding of heme and flavin on the apoprotein has to be compared with results obtained by Forestier and Baudras [22] in our laboratory. These authors were able to obtain products containing variable amounts of residual protoheme and about 50 p. cent residual FMN ; with these derivatives they have shown that the activity with respect to ferricyanide depends only upon the presence of FMN groups, whereas both prosthetic groups are involved in the electron transfer to cytochrome *c*.

The last experiment presented in this article shows that complete dissociation and denaturation of cytochrome b_2 with loss of all the prosthetic

groups are nevertheless reversible since an active tetramer could be recovered after a concentrated guanidine HCl treatment.

This work was supported by grants from the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique.

We are grateful do Dr. M. Iwatsubo for many valuable discussions and help in the fluorometric studies, and to Prof. P. P. Slonimski for his encouragements and the means put at our disposal. Mrs M. O. Mossey and Mr. E. Cros gave us a skilful assistance in the ultracentrifuge experiments and in cytochrome b_2 preparations respectively.

Résumé.

Les groupements prosthétiques — hème et flavine mononucléotide — du cytochrome b_2 (L-lactate cytochrome c oxydoréductase de la levure), un enzyme tetramérique, ont été dissociés par un traitement en guanidine 6 M.

Une hémoprotéine a été reconstituée quantitativement par addition de protohématine à l'apoprotéine. Le spectre hémochrome original est retrouvé.. Cette recombinaison a lieu quelque soit l'état de polymérisation de l'apoprotéine.

Les propriétés spectrales de l'apoprotéine ainsi que celles de l'hémoprotéine reconstituée ont été étudiées. Les résultats confirment la nature du groupement prosthétique héminique et la valeur du coefficient d'extinction de l'hémochromophore tel qu'il a été révisé récemment.

Dans des conditions appropriées d'incubation de l'apoprotéine avec de l'hémine et du FMN, un tétramère enzymatiquement actif a pu être reconstitué.

Zusammenfassung.

Die prosthetischen Häm- und Flavin-Gruppen des Cytochroms b_2 (L-Laktat-Cytochrom-c-Oxydoreduktase der Hefe), welches ein Tetramer-Enzym ist, wurden durch eine Behandlung mittels 6 M-Guanidinhydrochorid getrennt.

Ein Hämoprotein wurde quantitativ aus dem Apoprotein und dem Protohämatin wiederhergestellt. Das ursprüngliche Hämochromspectrum wurde wieder gefunden. Die Wiederherstellung wird vom Polymerzustand des Apoproteins nicht beeinflusst.

Unter geeigneten Bedingungen wurde ein enzymatisch aktives Tetramer nach Inkubation des Apoproteins mit FMN und Hämin wiederhergestellt.

REFERENCES.

1. Monteilhet, C. and Risler, J. L., *Eur. J. Biochem.*, 12 (1970) 165.
2. Appleby, C. A. and Morton, R. K., *Nature*, 173 (1954) 749.
3. Appleby, C. A. and Morton, R. K., *Biochem. J.* 73 (1959) 539.
4. Morton, R. K., *Nature*, 192 (1961) 727.
5. Baudras, A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 7 (1962) 310.
6. Baudras, A., *Bull. Soc. Chim. Biol.* 47 (1965) 1143.
7. Morton, R. K. and Shepley, K., *Biochem. Z.*, 338 (1963) 122.
8. Labeyrie, F., Groudinsky, O., Jacquot-Armand, Y. and Naslin, L., *Biochem. Biophys. Acta*, 128 (1966) 492.
9. Labeyrie, F., di Franco, A., Iwatsubo, M. and Baudras, A., *Biochem.*, 6 (1967) 1791.
10. Groudinsky, O., in preparation
11. Iwatsubo, M., and di Franco, A., unpublished results.
12. Meyei-Ninio, M., Filitti-Wurmser, S., Labeyrie, F., in preparation.
13. Appleby, C. A. and Morton, R. K., *Biochem. J.*, 71 (1959) 492.
14. Spyridakis, A., Naslin, L. and Labeyrie, F., submitted to publication in this journal.
15. Pajot, P. and Groudinsky, O., *Eur. J. Biochem.*, 12 (1970) 158.
16. Iwatsubo, M. and di Franco, A., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 46 (1965) 1793.
17. Edelhoch, H., *Biochem.*, 6 (1967) 1948.
18. Jacq, C. and Lederer, F., *Eur. J. Biochem.*, 12 (1970) 154.
19. Urry, D. W., *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 4441.
20. Baudras, A. and Labeyrie, F., in Structure and Function of Cytochromes. (K. Okunuki, M. D. Kamen and I. Sesuki, Editors) University Park Press, Baltimore, Manchester, 1968, p. 601.
21. Pajot, P., in preparation.
22. Forestier, J. P. and Baudras, A., Third International Symposium on Flavins and Flavoproteins, Durham 1969.

C H A P I T R E I I I

DISSOCIATION DES GROUPEMENTS PROSTHETIQUES DU FLAVOCYTOCHROME b_2 :

B - RECONSTITUTION DE LA FLAVOPROTEINE (DEHEMOCYTOCHROME b_2) ET ETUDE DE SES PROPRIETES SPECTRALES ET CATALYTIQUES.

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, il apparait possible d'obtenir par un traitement à la guanidine 6 M un dérivé apoprotéique du cytochrome b_2 dépourvu totalement d'hème et de FMN. Le traitement du cytochrome b_2 par la guanidine présente l'avantage considérable de provoquer une dénaturation qui apparait réversible. En effet, une dialyse renaturante de longue durée au cours de laquelle l'agent dissociant guanidine est éliminé permet de refixer les groupes prosthétiques (pratiquement 100 % d'hème et 70 % de FMN) sur la protéine et de récupérer une flavo-hémoprotéine ayant retrouvé une activité molaire notable (65 % de celle du flavocytochrome b_2 d'origine calculée par mole de FMN refixé) et sédimentant avec la même vitesse de sédimentation que le cytochrome b_2 natif.

Il apparait à priori possible d'obtenir à partir de l'apoprotéine une flavoprotéine, qui serait le dérivé "flavodéhémocytochrome b_2". Un traitement renaturant de l'apoprotéine en présence de FMN seulement devrait fournir un tel dérivé. Au moment où nous avons entrepris ce travail un dérivé déflavocytochrome b_2 avait été obtenu depuis plusieurs années par Morton et al (58) et parallèlement par Baudras (59) et étudié en détails. Un dérivé flavodéhémoprotéique était considéré comme beaucoup plus difficile à obtenir, l'hème étant fixé à la protéine beaucoup plus solidement que la flavine. Morton et Shepley en 1963 (57) décrivent l'obtention d'une telle flavoprotéine ainsi que d'une apoprotéine, obtenues par traitement du flavocytochrome b_2 à l'acétone acide. Cependant l'examen des données montre que d'une part les préparations de flavohémoprotéine reconstituée à partir de l'apoprotéine ont une activité enzymatique très faible (< 1 %), d'autre part que la flavoprotéine obtenue n'a pas non plus d'activité enzymatique, et ne peut être réactivée par incubation avec du protohème. Dans ces deux dérivés le FMN ne peut être réduit par le lactate et il est fluorescent. Or les études de M. Iwatsubo et A. Di Franco (26) ont montré que la fluorescence du FMN est éteinte lors de sa fixation au déflavocytochrome b_2. Les dérivés de Morton et

Shepley apparaissaient donc comme étant extrêmement dénaturés et aucune conclusion n'a pu être tirée quant au rôle des groupes hème et FMN dans la catalyse enzymatique.

Plus récemment, J.P. Forestier et A. Baudras (27), mettant à profit l'observation que l'hème se dissocie de la protéine en milieu guanidine, ont obtenu des dérivés possédant des taux variables d'hème et de flavine. Leur méthode consistait à incuber le flavocytochrome b_2 au froid, pendant 1 heure avec des concentrations variables de guanidine, puis à renaturer par une dialyse de longue durée (60 heures) en présence de lactate. Ils obtenaient des dérivés possédant entre 65 et 75 % de flavine et entre 12 et 100 % d'hème. En extrapolant les résultats (activité par mole de FMN fixé) à des concentrations en hème nulles, leur étude tendait à montrer que la présence de l'hème est indispensable pour le passage des électrons du L-lactate à l'accepteur physiologique le cytochrome c, alors qu'il n'est pas indispensable pour le passage des électrons au ferricyanure. Cependant l'étude catalytique de ces dérivés est rendue délicate car ils ne possèdent au maximum que 25 % de l'activité molaire (par flavine) du flavocytochrome b_2 de départ et d'autre part ils sont très instables. Ils n'ont pu être étudiés que sous la forme réduite, car dès que l'on élimine le lactate la flavine se dissocie, ce qui entraine l'inactivation du composé.

Nous avons voulu reprendre ce problème et préparer une flavoprotéine dépourvue d'hème de manière à pouvoir étudier ses propriétés structurales et fonctionnelles. Nous avons pu effectivement obtenir un tel dérivé flavoprotéique. Nous avons étudié ses propriétés optiques par spectres d'absorption et par spectre dichroique. Nous avons également effectué des études cinétiques rapides et stationnaires sur ce dérivé en collaboration avec M. Iwatsubo.

Matériel et Méthodes

Préparation de l'apoprotéine : Des cristaux de flavocytochrome b_2 type II fraichement préparés, d'activité molaire voisine de 220 s^{-1} sont dissouts dans un volume minimum d'une solution de tampon phosphate 0.1 M pH 7.2 contenant de la guanidine 6 M, de l'EDTA 20 µM, du β mercaptoéthanol 0.1 M, pour obtenir 2 ou 3 ml d'une solution ayant une concentration protéique de 15 mg/ml. Cette solution est laissée à dialyser à température ambiante contre le même tampon pendant 2 heures. Le protohème se détache de la protéine et cristallise en grains noirs. Il est éliminé en grande partie par une centrifugation de 15 minutes à 27 000 g. L'hème et la flavine résiduelles sont totalement éliminés par passage du surnageant de la centrifugation sur une colonne de Séphadex G 25 (1,5 x 10 cm) équilibrée et développée avec le tampon initial contenant de la guanidine 3 M au lieu de 6 M. La protéine est recueillie à la sortie de la colonne dans un volume de 9 ml.

La concentration en protéine est estimée d'après la teneur en tryptophane mesurée par fluorescence suivant une méthode originale décrite dans l'article du chapitre II.

La concentration en FMN est mesurée fluorométriquement. Le FMN total est mesuré d'après l'intensité de fluorescence dans l'urée 6M, après étalonnage avec du FMN commercial dans le même milieu. En effet, la fluorescence du FMN libre n'est pas la même en tampon phosphate et dans l'urée. Le FMN non fixé à la protéine est mesuré d'après l'intensité de fluorescence d'une même aliquote en tampon phosphate. Le FMN fixé à la protéine est déterminé comme étant la différence entre le FMN total et le FMN libre.

Les spectres optiques sont tracés au moyen d'un spectrophotomètre Cary 15.

Les spectres dichroiques sont tracés au moyen d'un appareil Roussel Jouan "Dichrographe II".

Les activités molaires (par moles de flavine fixées) pour les accepteurs ferricyanure ou cytochrome c sont mesurées sur un spectrophotomètre Zeiss muni d'un enregistreur Sargent L dans les

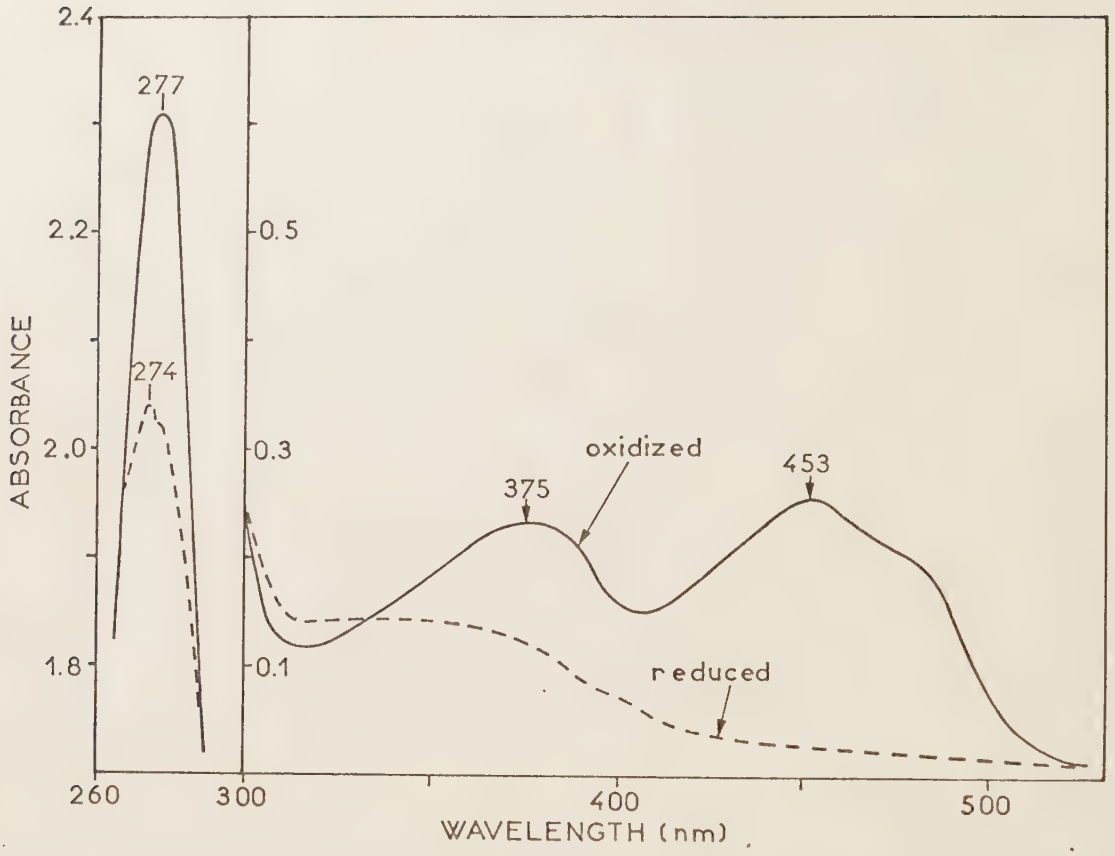


Figure 1 : Spectres d'absorption du dérivé flavoprotéique sous forme oxydée et réduite.

850 µl d'une solution de flavoprotéine oxydée, 35 µM en protéine et 19,5 µM en flavine fixée (obtenue après passage sur colonne de Séphadex G 25 suivant les conditions expérimentales décrites dans le texte) sont placés dans une cuve spectrophotométrique à 23°C. L'échantillon est ensuite réduit par addition dans la cuve de 30 µl de L-lactate 600mM.

conditions standard définies par Spyridakis et al (60) (EDTA 13 µM, DL-lactate 16,6 mM, dans un tampon phosphate 66 mM, pH 7,3 lorsque l'accepteur est le ferricyanure 0,66 mM ou dans un tampon phosphate 6,6 mM pH 7,3 lorsque l'accepteur est le cytochrome c 30 µM).

Les mesures de cinétique rapide sont effectuées sur un stopped flow Gibson Durrum.

Résultats

I - Préparation de la flavoprotéine

L'apoprotéine dont la préparation a été décrite dans Matériel et Méthodes est renaturée immédiatement après sa sortie de la colonne par une dialyse de 3 jours à 4°C contre un tampon phosphate 0.15 M pH 7,2 (27) contenant du lactate 50 mM, du β mercaptoéthanol 0,1 M et de l'EDTA 20 µM. De la flavine mononucléotide commerciale en excès est ajoutée à l'apoprotéine. Le tampon de dialyse est changé 4 ou 5 fois. Après 3 jours la solution dans le sac de dialyse qui contient du lactate est de couleur jaune pâle. Par élimination du lactate sur Séphadex elle devient jaune d'or. Ceci indique qu'une grande partie de la flavine présente a été réduite par le L-lactate et se trouve vraisemblablement bien fixée à la protéine.

La flavoprotéine obtenue sous forme réduite en présence de lactate et de β mercaptoéthanol est très stable et peut se conserver 3 semaines sans perte de FMN et de ses propriétés catalytiques.

II - Propriétés spectrales

1) Spectres d'absorption

Pour effectuer le spectre de la flavoprotéine oxydée on élimine le lactate, le β mercaptoéthanol et la flavine non fixée par passage d'un échantillon de 1 ml sur une petite colonne de Séphadex G 25 (1 x 5 cm) équilibrée en tampon phosphate 0,1 M pH 7,2.

On a tracé les spectres de la flavoprotéine à l'état oxydé (Fig. 1) puis après réduction par le L-lactate. L'échantillon contenait moins de 2 % de flavine libre. La flavine a été dosée

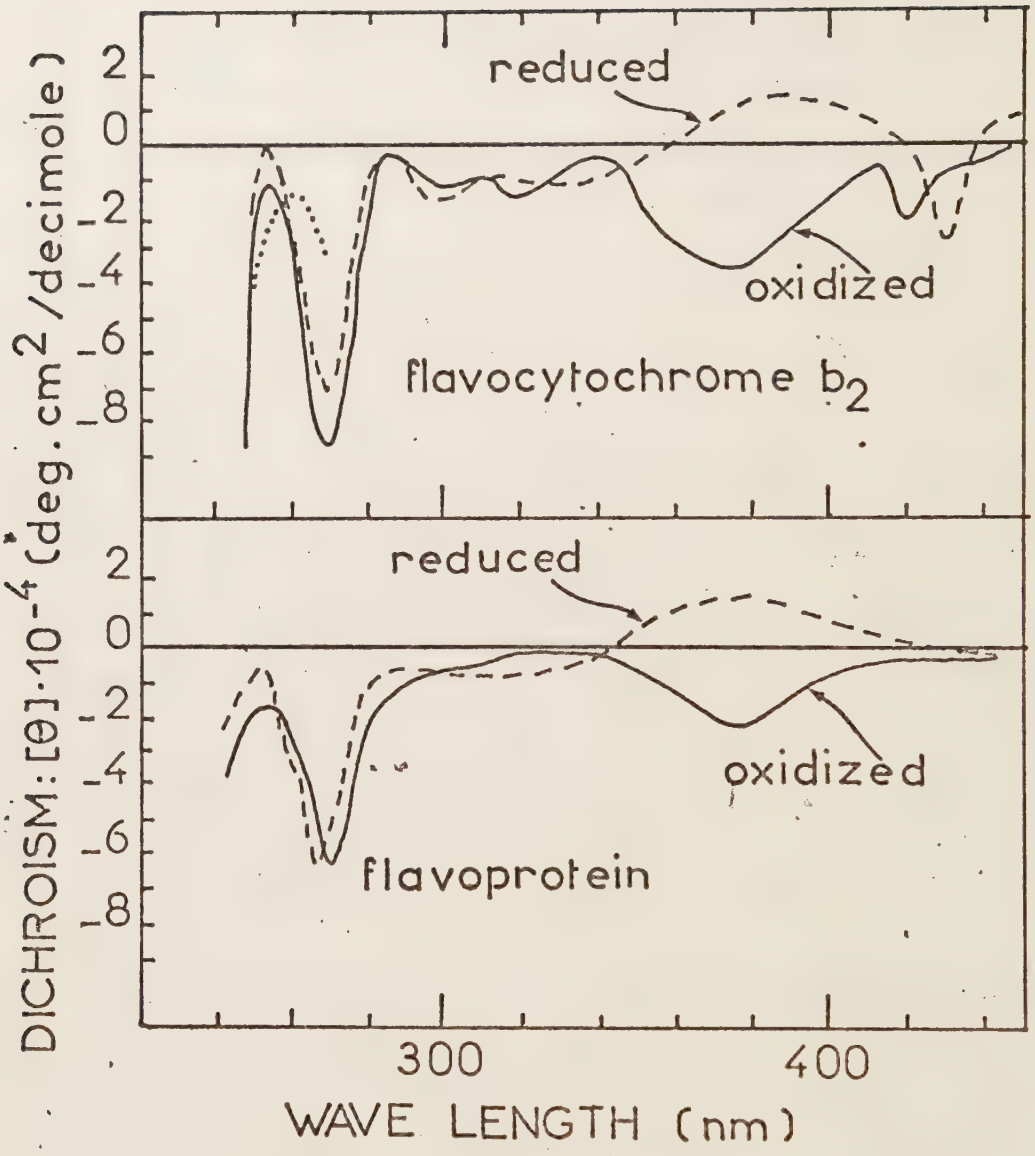


Figure 2 : Dichroisme circulaire du flavocytochrome b_2 et du dérivé flavoprotéique.

Flavocytochrome b_2 14,6 µM ; dérivé flavoprotéique 32 µM en protéine et 15 µM en flavine fixée. Tampon phosphate 0,1 M, EDTA 20 µM, (pH 7,2), 23°. Les échantillons sont réduits par 30 µl de L-lactate 600 mM.

par sa fluorescence avec une précision de 5 %. Le spectre oxydé présente deux pics à 375 nm et à 453 nm et un épaulement à 480 nm caractéristique des flavoprotéines oxydées. On a pu déterminer les coefficients d'extinction : $\varepsilon_{ox453} = 12,5 \pm 0,3\ mM^{-1}cm^{-1}$, $\varepsilon_{red453} = 1,4 \pm 0,2\ mM^{-1}cm^{-1}$; $(\varepsilon_{ox} - \varepsilon_{red})_{453} = 11,0 \pm 0,5\ mM^{-1}cm^{-1}$. On a calculé les coefficients d'extinction au point isobestique de l'hème ; $\varepsilon_{ox438,5} = 11,3 \pm 0,3\ mM^{-1}cm^{-1}$; $\varepsilon_{red438,5} = 1,8 \pm 0,2\ mM^{-1}cm^{-1}$. Signalons que la précision de ces déterminations a été limitée par la faible concentration des solutions utilisées $\sim$ 20 µM. Notons que la contribution de la protéine à l'absorption UV et visible est nulle au dessus de 310 nm (voir article du chapitre II).

Le spectre de la flavine fixée à l'état oxydé avait été tracé par A. Baudras (61) par différence entre les spectres du flavocytochrome b_2 oxydé et du déflavocytochrome b_2, en supposant l'additivité des absorbances des deux chromophores hème et FMN. L'allure générale du spectre ainsi obtenu est la même que celle du spectre que nous obtenons avec la flavoprotéine. L'extinction molaire calculée par A. Baudras à 453 nm était 11,5 $mM^{-1}cm^{-1}$, valeur très proche de celle trouvée par nous, à savoir 12,5 $mM^{-1}cm^{-1}$. Il n'avait pas été possible de tracer le spectre de la flavine fixée à l'état réduit. En effet le spectre de différence semblait mettre en évidence un très léger déplacement (0,5 nm) du pic de l'hème réduit vers les courtes longueurs d'onde lorsque la flavine était éliminée.

2) Spectre dichroique

On voit sur la figure II le spectre dichroique de la flavoprotéine. A l'état oxydé, le FMN se manifeste par une bande négative à 375 nm et une ellipticité molaire $\theta = 3,1 \pm 0,2 \times 10^4\ dgcm^2$/decimole . Lorsque la flavoprotéine est réduite par le L-lactate cette bande devient positive avec un maximum à 380 nm et une ellipticité $\theta = 2,1 \pm 0,2\ 10^4\ dgcm^2$/decimole.

Remarquons que la flavine fixée dans cette flavoprotéine présente les mêmes bandes que la flavine dans le flavocytochrome b_2. Ceci est une indication que la flavine a retrouvé sur l'apoprotéine un environnement électronique identique à son environnement dans le flavocytochrome b_2 initial. Notons que l'effet Cotton de la flavine est dû à une

	flavocyt. b_2	flavoprotéine
activité (élec.sec^{-1}/mole FMN fixé) 15° pH 7,2 ferricy.	110	70
cyt. c	90	0
K_m (mM)	0,8 (28)	0.75
FMN prosthétique vitesse de réduction k_{red} (sec^{-1})	54 (63)	65
constante de fixation du ferricyanure k_{II} ($M^{-1}sec^{-1}$)	$3\ 10^7$ (63)	$2.3\ 10^5$

Tableau I : COMPARAISON DES PROPRIETES CINETIQUES DU FLAVOCYTOCHROME b_2 ET DE LA FLAVOPROTEINE.

asymétrie du chromophore induite par la protéine puisque la flavine libre ne manifeste qu'une très faible activité dichroique circulaire.

3) Fluorescence flavinique

Alors que le FMN oxydé à l'état libre fluoresce lorsqu'on l'excite à 450 nm, on sait que le FMN fixé sur le flavocytochrome b_2 oxydé ne fluoresce pas (26). Bien que très fréquent ceci n'est pas un cas général des groupements prosthétiques flaviniques, puisque par exemple le FAD lié à la lipoamide déshydrogénase fluoresce à l'état oxydé (62). Aussi s'était-on posé la question de savoir si la fluorescence du FMN oxydé du cytochrome b_2 n'était pas éteinte par la présence de l'hème. Ceci est à priori possible puisque l'hème absorbe dans la région du spectre où l'on observe la fluorescence de la flavine libre. Nous avons vérifié qu'il n'en est pas ainsi. En effet la fluorescence de la flavine est éteinte dans le dérivé flavoprotéine aussi bien que dans le flavocytochrome b_2.

III - Etudes cinétiques

1) Etude de l'activité enzymatique

Le dérivé flavoprotéique décrit dans les paragraphes précédents manifeste une activité enzymatique importante dans le système L-lactate $\longrightarrow$ ferricyanure mais aucune activité dans le transfert du L-lactate au cytochrome c.

Cette flavoprotéine a donc gardé une partie des propriétés de flavodéshydrogénase qui caractérisaient le flavocytochrome b_2 entier. Le tableau I donne les valeurs des activités molaires comparativement pour ces deux formes enzymatiques. On voit que, pour un taux de flavine fixée d'environ 70 %, l'activité molaire par flavine fixée est de 70 sec^{-1} à 15°C (avec L-lactate 16,6 mM et ferricyanure 0,66 mM ; concentrations qui sont saturantes pour le flavocytochrome b_2 entier) c'est à dire 64 % de celle de l'"holo"enzyme initial.

2) Cinétiques rapides

a) Etude de la réduction par le L-lactate :

Nous avons travaillé avec des solutions déoxygénées. Il apparait tout d'abord d'après les niveaux d'absorption initial et final (fig. 3 a) que toute la flavine présente est réductible avant 100 msec. En travaillant dans des conditions où la concentration en substrat est en excès par rapport à la flavine on constate que la réaction est monophasique et de pseudo ordre 1 (Fig. 3). Il y a une saturation par le L-lactate démontrant la formation d'un complexe stable avant le transfert des électrons. A des concentrations de L-lactate saturantes on obtient la constante de vitesse maximale de transfert des électrons dans le complexe (flavoprotéine-substrat). qui est de 60-70 sec^{-1} à 15°C. La valeur pour le flavocytochrome b_2 avait été trouvée égale à 54 s^{-1} à 14,5°C (63). Nous obtenons également la valeur de la constante de Michaelis K_m = 0,75 mM qui est voisine de celle trouvée pour le flavocytochrome b_2 entier à savoir 0,8 - 0,9 mM (28).

b) Etude de la réoxydation de la flavine par le ferricyanure :

Nous avons travaillé sur une solution déoxygénées contenant de la flavoprotéine (20 µM) réduite par du L-lactate 150 µM (concentration finale). Le L-lactate est en excès par rapport à la flavoprotéine pour éviter une réoxydation par l'oxygène résiduel dissous dans la solution (10 à 12 µM). Nous avons suivi à 470 nm la reoxydation de la flavoprotéine par le ferricyanure. Du tracé de la figure (4) nous calculons la constante apparente de vitesse de réoxydation par le ferricyanure. La réaction est monophasique et de 1° ordre, ce qui est une indication que la solution de flavoprotéine est homogène. La variation de la constante apparente de vitesse de 1° ordre en fonction de la concentration de ferricyanure nous donne une droite dont la pente représente la constante bimoléculaire de la fixation du ferricyanure. Remarquons que même pour des concentrations élevées en ferricyanure (1,3 mM) la représentation reste linéaire (fig. 5). Ceci indique que le phénomène observé reste bimoléculaire, et que l'on n'a pas observé de saturation par le ferricyanure. La valeur trouvée pour la constante de fixation du ferricyanure k_{II} = 2,3 x $10^5 M^{-1}s^{-1}$ est beaucoup plus faible que celle qui avait été trouvée pour le cytochrome b_2 tout entier à savoir 3 x 10^7 $M^{-1}s^{-1}$.(63).

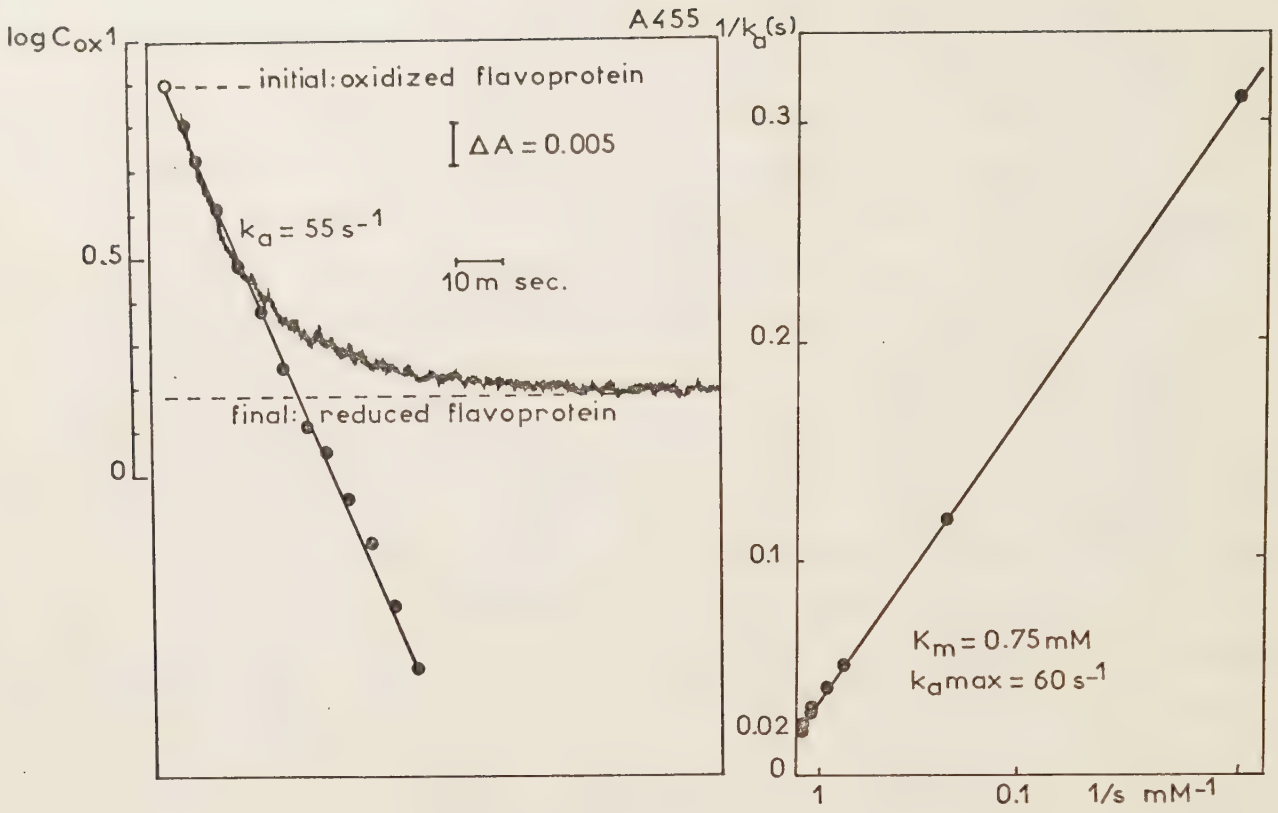


Figure 3 a : Tracé oscilloscopique de la réduction de la flavoprotéine par le L-lactate réalisée dans un stopped flow.

La réduction du FMN est observée à 455 nm. Du L-lactate est mélangé dans le stopped flow avec la flavoprotéine, donnant les concentrations finales : FMN fixé 3,3 µM. ; L-lactate 5 mM dans un tampon phosphate 0,1 M, EDTA 20 µM, pH 7,2 à 15°. Le logarithme de la différence des absorbances $A_{ox} - A_{red}$ est porté en fonction du temps. La pente de la ligne droite donne la constante apparente de vitesse de 1° ordre de réduction de la flavoprotéine $k_a = 55\ s^{-1}$.

Figure 3 b : Variation de $1/k_a$ en fonction de 1/L-lactate.

La concentration finale du L-lactate variait de 50 µM à 5 mM.

Discussion

L'étude du dérivé flavoprotéique que nous avons obtenu semble particulièrement interessante. L'extinction de la fluorescence du FMN par la protéine indique que la flavine s'est refixée. De plus l'étude du spectre dichroique montre que la flavine a retrouvé sur ce dérivé un environnement électronique identique à son environnement dans le flavocytochrome b_2 initial.

Ce dérivé apparait comme un matériel de choix pour étudier le mécanisme d'introduction des électrons dans l'enzyme. Ce problème a déjà fait l'objet d'études approfondies effectuées par divers auteurs : A. Baudras (24); C. Capeillère et al. (30, 63). Des études cinétiques avaient apporté des arguments en faveur de la flavine comme premier accepteur des électrons du L-lactate.

Le problème des rapports entre la flavine et le substrat a été repris récemment par F. Lederer (64). Elle a montré que le site de la flavine se trouverait vraisemblablement très proche du site du substrat. En effet l'acide 2-hydroxy-3-butynoique qui peut servir de substrat à l'enzyme établirait une liaison covalente avec la flavine.

L'étude des propriétés cinétiques que nous avons effectuée sur le dérivé flavoprotéique a montré que ce dérivé se comporte comme une flavodéshydrogénase. Il forme un complexe stable avec le L-lactate et les électrons sont transférés du L-lactate à la flavine avec une constante de vitesse de 70 s^{-1}. Cette vitesse est voisine de celle trouvée pour les meilleurs échantillons de flavocytochrome b_2 cristallisé à la même température.

Ces résultats indiquent que le passage des électrons du L-lactate à la flavine se fait apparemment de la même manière dans le flavocytochrome b_2 et dans la flavodéshydrogénase privée du groupe héminique. On peut ainsi affirmer de manière certaine que la flavine est le premier accepteur des électrons du L-lactate, et confirmer ainsi des résultats obtenus par Capeillère et al., Baudras et Lederer.

Notons que la valeur du K_m pour le complexe flavoprotéine-L-lactate est la même que celle du K_m du complexe flavocytochrome b_2-L-lactate. L'hème par conséquent ne modifie pas l'affinité lactate-flavine.

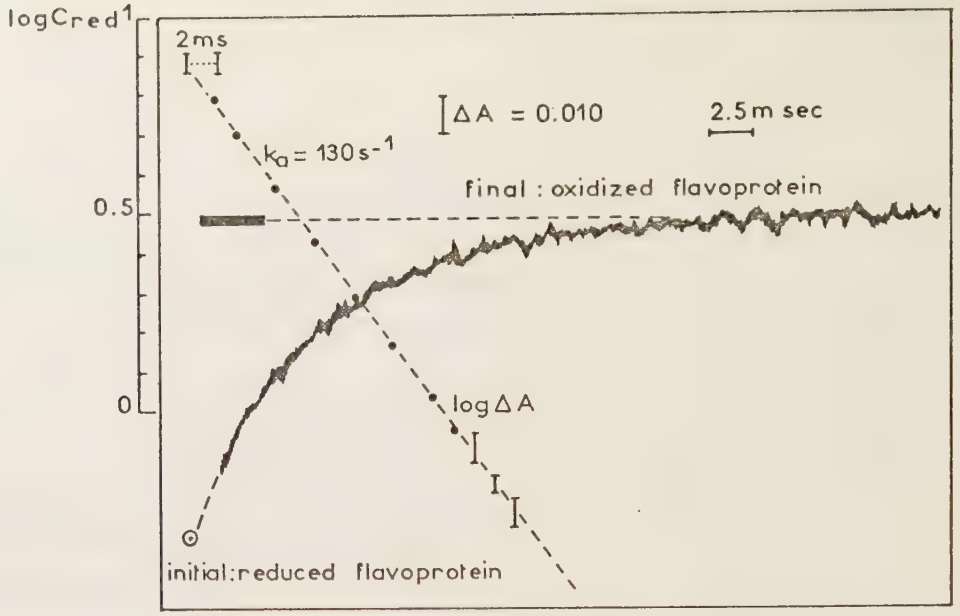


Figure 4 : Tracé oscilloscopique de la réoxydation de la flavoprotéine par le ferricyanure réalisée dans un stopped flow.

La réoxydation du FMN est observée à 470 nm. Du ferricyanure est mélangé dans le stopped flow avec la flavoprotéine donnant les concentrations finales ; FMN fixé 4,6 µM ; ferricyanure 1 mM dans un tampon phosphate 0,1 M, EDTA 20 µM, pH 7,2 à 15°. Le logarithme de la différence des absorbances $A_{ox} - A_{red}$ est porté en fonction du temps. La pente de la ligne droite donne la constante apparente de vitesse du 1° ordre de reoxydation de la flavoprotéine $k_a = 130\ s^{-1}$.

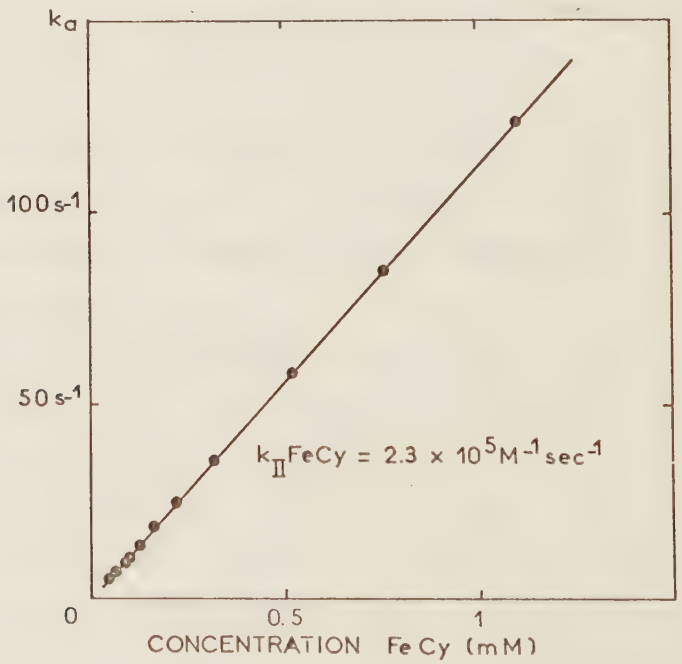


Figure 5 : Détermination de la constante bimoléculaire de fixation du ferricyanure au dérivé flavoprotéique

La constante apparente de vitesse du 1° ordre de la réoxydation k_a est calculée pour différentes concentrations de ferricyanure de 33 µM à 1,1 mM (concentrations finales).

Notons de plus que l'hème n'a aucune influence sur le dichroisme de la flavine fixée à la protéine.

Nous avons confirmé sur ce dérivé les résultats obtenus par Forestier et Baudras (27) ; à savoir que l'hème est indispensable pour le passage des électrons au cytochrome c. Pour le passage des électrons de l'enzyme au ferricyanure, nous trouvons que l'hème n'est pas indispensable. Cependant la constante de vitesse bimoléculaire de fixation du ferricyanure est 100 fois plus faible dans ce composé flavoprotéique que dans le flavocytochrome b_2. Pour expliquer cette différence nous avons pensé à deux explications :

1) La partie flavoprotéique est modifiée après séparation de l'hème et l'accès du ferricyanure à la flavine est rendu plus difficile. Cette hypothèse est cependant en contradiction avec les observations précédemment décrites, spectrales et cinétiques, qui semblent indiquer que la partie flavoprotéique n'est pas modifiée ni dans sa fonction ni dans sa structure.

2) Dans le flavocytochrome b_2 les électrons passent principalement par l'hème. La constante de vitesse déterminée serait celle de l'échange ferricyanure-site héminique. Si la flavoprotéine elle-même est inchangée, cela voudrait dire que la voie de reoxydation par la flavine n'est pratiquement pas fonctionnelle dans le cytochrome b_2 entier.

Dans le flavocytochrome b_2 entier, l'étape limitante de la réaction catalytique est celle du passage des électrons du L-lactate fixé à la flavine prosthétique, tandis que pour ce dérivé flavoprotéique la vitesse catalytique est aussi limitée par une deuxième étape, à savoir la vitesse de fixation du ferricyanure. Ceci explique pourquoi l'activité molaire de ce dérivé est 70 sec^{-1} et non 120 sec^{-1} comme dans le flavocytochrome b_2 entier.

Nous avons dans une expérience préliminaire essayé de déterminer comment dans ce dérivé flavoprotéique les 2 électrons du L-lactate sont passés à la flavine. Sont-ils passés en même temps ou bien un par un. Dans ce dernier cas il y aurait formation d'une flavine semi-quinone. Nous avons effectué des spectres du dérivé

flavoprotéique au cours de la titration anaérobique par le L-lactate. Nous n'avons jamais observé spectralement de forme semiquinonique de la flavine.

Les résultats de C. Capeillère, Iwatsubo, Bray et Labeyrie (30) avaient montré que pendant la réduction du flavocytochrome b_2 la flavine reçoit d'abord les deux électrons du L-lactate. Mais il y aurait échange très rapide intramoléculaire des électrons entre les flavines conduisant à la formation d'à peu près 50 % de flavine semiquinone.

Si l'absence de flavine semiquinone est confirmée dans la flavoprotéine, cela pourrait signifier que l'hème est nécessaire au transfert rapide des électrons flavine $\longrightarrow$ flavine.

C H A P I T R E I V

CARACTERISATION DES DEUX GLOBULES α et β DU FLAVOCYTOCHROME b_2

PAR REFIXATION D'HEME ET DE FLAVINE

Introduction

Le flavocytochrome b_2 (L-lactate cytochrome c oxydoreductase) de la levure Saccharomyces cerevisiae est un tétramère de poids moléculaire 235 000 - 240 000 (18,19). Chaque monomère de poids moléculaire 53 000 - 58 600 (20, 21) porte un hème et une flavine. Lorsqu'il est préparé sous forme cristallisée le monomère est formé de deux chaines polypeptidiques maintenues ensemble par des interactions non covalentes. Ces chaines classiquement dénommées α et β ont des poids moléculaires de 21 000 - 24 000 et 36 000 - 39 000 respectivement (50, 19). Il a été récemment démontré que ces deux chaines α et β étaient le résultat d'une coupure protéolytique de la chaine unique qui forme le monomère (53,65-66). Cette coupure se produit sur une zone de la chaine polypeptidique hypersensible à l'action des protéases et donc vraisemblablement flexible et exposée au solvant. L'action des protéases conduisant à la formation de fragments de taille importante, on admet que ces fragments constituent des entités structurales relativement compactes que l'on nomme globules.

Nous avons abordé le problème de savoir quelle est la répartition des sites spécifiques des groupes prosthétiques hème et flavine sur le monomère58 600. Sont-ils chacun sur le même globule ou chacun sur un globule différent ?

Les globules α et β se dissociant dans la guanidine 6 M avec dissociation de l'hème et de la flavine, il a été possible après filtration moléculaire sur colonne Séphadex G-75 de séparer les globules α et β & d'observer comment l'hème et la flavine se refixent au cours d'un traitement renaturant sur chaque globule séparé.

Matériel et Méthodes

Le cytochrome b_2 type II cristallisé a été préparé selon une méthode décrite précédemment (60). Des cristaux de l'enzyme ont été dissous et dialysés pendant une heure contre un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,2 contenant de l'EDTA 20 µM, de la guanidine 6M et du β mercaptoéthanol 0,1 M. Ce traitement dissocie l'enzyme en sous-unités et dissocie également les groupes prosthétiques hème et flavine. L'enzyme est ensuite chromatographié sur une colonne de Séphadex G-75 (2,5 x 100 cm) équilibrée et développée avec le tampon précédent contenant de la guanidine 3 M au lieu de 6 M. Des fractions de 3 à 4 ml ont été recueillies. Ces fractions ont été renaturées en présence d'un excès de protohème (Sigma) et de flavine mononucléotide (Sigma) par une dialyse de 3 jours à 4°C contre du tampon phosphate 0,15 M à pH 7 contenant du DL-lactate 50 mM, du β mercaptoéthanol 0,1 M et de l'EDTA 20 µM.

Pour les caractérisations par électrophorèse quelques fractions ont été dialysées contre une solution d'acétate d'ammonium 0,1 M et lyophilisées. Une heure avant l'électrophorèse elles étaient dissoutes dans un tampon de phosphate de sodium 10 mM à pH 7,2 contenant 1 % de dodecyl-sulfate, de l'urée 8 M, du β mercaptoéthanol 50 mM et 0,05 % de bleu de bromophénol. L'électrophorèse était effectuée en sodium dodécyl sulfate selon la méthode décrite par Shapiro et coll. (51).

La concentration en hème refixé a été déterminée spectrophotométriquement à 413 ou 423 nm sur un Cary 15 en prenant $\varepsilon_{423} = 183\ mM^{-1}cm^{-1}$ et $\varepsilon_{413} = 129\ mM^{-1}cm^{-1}$ comme pour l'enzyme natif, ceci ayant été justifié par des études antérieures. La refixation de la flavine a été suivie par fluorescence. La teneur en tryptophane des fractions était estimée suivant une méthode de fluorescence décrite au chapitre II. Les concentrations protéiques étaient déterminées selon Lowry et al. (67), en utilisant le flavocytochrome b_2 comme standard. Les mesures d'activité avec le cytochrome c ou le ferricyanure comme accepteurs ont été effectuées selon les conditions décrites dans (60).

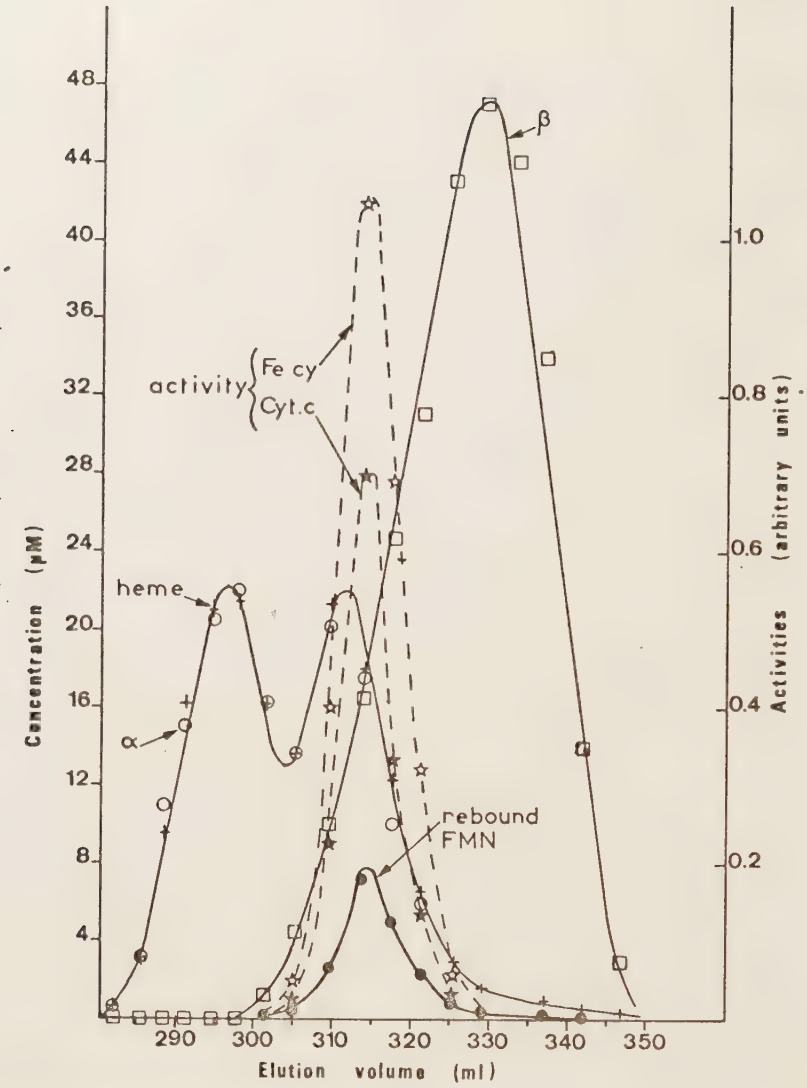


Figure 1 : Fractionnement par filtration sur Séphadex G-75 des sous-unités du cytochrome b_2 dissocié dans la guanidine.

2 ml d'une solution de cytochrome b_2 (30 mg/ml) dans la guanidine 6 M sont appliqués sur la colonne (2,5 x 100 cm) de Séphadex G-75 équilibrée et développée à 25° avec un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,2 contenant de l'EDTA 20 µM, de la guanidine-HCl 3 M et du β mercaptoéthanol 0,1M. La vitesse d'écoulement était de 10 ml/h. Des fractions de 3-4 ml étaient renaturées et soumises à l'analyse décrite dans le texte. + concentration µM en hème refixé ; ● concentration en FMN refixé ; ✦ activité cytochrome c réductase ; ✧ activité ferricyanure réductase ; ○ concentration µM calculée de la chaine lourde ; □ concentration µM calculée de la chaine légère.

Résultats et discussion

Après filtration sur gel du flavocytochrome b_2 dissocié en guanidine 6 M sur colonne de Séphadex G-75, les fractions protéiques éluées ont perdu leurs groupes prosthétiques hème et FMN. Elles ont été renaturées par dialyse contre un tampon phosphate en présence d'un excès de protohème et de FMN. Pour chaque fraction, nous avons effectué un certain nombre de déterminations : 1) la concentration en tryptophanes $(T)_{\mu M}$, 2) la concentration protéique $(C)_{\gamma/ml}$, 3) la concentration en hème $(H)_{\mu M}$ ou en flavine $(F)_{\mu M}$ refixés, 4) les activités molaires avec le ferricyanure et le cytochrome c comme accepteurs exprimées par moles de FMN fixées. Pour évaluer les concentrations (X) et (Y) des chaines lourdes α et légères β dans chaque fraction, une estimation suffisante peut être faite de la façon suivante : les poids moléculaires des chaines étant 36 000 et 21 000 respectivement, nous avons approximativement l'équation :

$$36\,(X)_{\mu M} + 21\,(Y)_{\mu M} = (C)_{\gamma/ml} \qquad (1)$$

De plus, sachant que les chaines lourdes et légères contiennent respectivement 4 et 1 résidus tryptophanes (50) nous avons l'équation :

$$4\,(X)_{\mu M} + (Y)_{\mu M} = (T)_{\mu M} \qquad (2)$$

De la détermination simultanée de (C) et de (T) dans chaque fraction, (X) et (Y) peuvent être calculés. Sur la figure 1 nous avons porté les concentrations calculées de chaines lourdes et légères (X) et (Y) en fonction du volume élué. Il apparait que les fractions de tête, jusqu'à 300 ml, sont pratiquement dépourvues de composant léger. La chaine lourde semble être éluée en 2 pics. On peut voir que la concentration en hème refixé (H) correspond rigoureusement avec la concentration en composant lourd (X) calculéed'après les équations (1) et (2) avec le rapport : 1 hème / 1 chaine lourde.

Dans une série d'expériences d'ultracentrifugation à l'approche d'équilibre en milieu guanidine 6M réalisées antérieurement (19), ces fractions apparaissaient homogènes avec un poids moléculaire M_w = 39 700.

On peut voir sur la figure (2) que lorsque les fractions de tête sont analysées par électrophorèse sur gel d'acrylamide en SDS elles donnent deux bandes. La mobilité de ces bandes permet d'attribuer aux deux composants des poids moléculaires voisins de 36 000 et 70 000. Aussi il nous parait vraisemblable que le composant le plus gros corresponde à un dimère de la chaine lourde du cytochrome b_2, non dissocié en sodium dodecyl sulfate, β mercaptoethanol malgrè un traitement préalable par l'urée 8 M. D'après le profil d'élution de la Fig. (1) nous voyons que ce dimère est élué de la colonne G-75 en milieu guanidine 3 M, β mercaptoethanol comme une entité moléculaire bien définie.

Lorsque les équations (1) et (2) sont appliquées aux fractions terminales les valeurs calculées pour la chaine lourde sont nulles ou légèrement négatives car le système de calcul n'est pas absolument exact. Aussi on a admis que la concentration de la chaine lourde était égale à la concentration en hème refixé ; en effet tous les résultats antérieurs ont montré que le taux de fixation de l'hème sur l'apoprotéine est proche de 100 %. La concentration de la chaine légère a été déterminée comme étant égale à la concentration totale en protéine moins la concentration en hème refixé. D'après cette définition le profil d'élution de la chaine légère se présente comme sur la figure (1). Nous avons calculé d'après les surfaces sous chaque pic que nous récupérons à la sortie 70 % des chaines lourdes et 90 % des chaines légères déposées sur la colonne . Ces chiffres montrent que l'ensemble des résultats est cohérent.

La flavine ne se refixe que sur les fractions du milieu (fig.1) qui sont un mélange des chaines lourdes et légères. Nous avons calculé que dans chaque fraction la quantité de FMN qui se refixe atteint 50 % de la quantité de flavocytochrome b_2 tétramère qui pourrait théoriquement se reformer à partir du mélange des deux chaines. Ce taux de fixation n'est guère plus mauvais que celui que nous avons obtenu précédemment avec l'apoprotéine après addition de FMN (chapitre III).

Figure 2 : Séparation et identification des sous-unités du cytochrome b_2 par électrophorèse sur gels d'acrylamide en sodium dodécylsulfate 0,1 %.

I cytochrome b_2 entier ; II chaine lourde isolée dans les fractions de tête d'élution ; la bande lente correspond vraisemblablement au dimère de la chaine lourde. ($M_w \sim 70\,000$) ; III mélange des chaines lourdes (8 %) et des chaines légères (92 %) dans les fractions de queue d'élution. La migration électrophorétique a lieu du haut vers le bas.

Les fractions du milieu qui ont refixé de la flavine présentent une activité molaire notable. Cette activité, calculée par rapport à la concentration en FMN refixé atteint 80 % de l'activité du flavocytochrome b_2 entier.

Ces résultats nous apportent quelques renseignements sur la structure du flavocytochrome b_2. Il semble que la séquence des acides aminés de la chaine lourde seule fournit assez d'informations pour reformer le site de fixation de l'hème. On avait déjà observé que le site de l'hème pouvait être reformé à partir de l'apoprotéine (sans hème, ni FMN), ceci même après un traitement fortement dénaturant par la guanidine 6 M (chapitre II). On savait aussi que, le site de l'hème est conservé dans son intégrité dans le dérivé protéolytique du cytochrome b_2 de 11 000 daltons appelé "noyau cytochromique b_2".

Quand au site de la flavine les expériences n'ont pu mettre en évidence s'il se trouvait sur l'une ou l'autre des deux chaines et deux possibilités peuvent être envisagées.

1) le site fait intervenir des aminoacides appartenant aux deux chaines

2) le site fait intervenir les aminoacides d'une seule chaine. Cependant le site ne peut acquérir sa conformation que lorsque les 2 chaines interagissent l'une avec l'autre.

Il est interessant d'observer que le globule α présente une forte tendance à former des dimères puisque l'espèce α^2 peut être éluée d'une colonne de Séphadex en milieu guanidine 3M.

Notons que des polymères de la chaine α ont été observés par ultracentrifugation analytique (68), alors que des polymères de la chaine β n'ont jamais été observés. Ces résultats suggèrent que les globules α interagissent entre eux dans la formation du tétramère. Les globules β au contraire ne semblent pas jouer de rôle dans les contacts entre protomères.

C O N C L U S I O N G E N E R A L E

Le flavocytochrome b_2 est-il l'association d'une déshydrogénase à flavine et d'un cytochrome ? Cette hypothèse avait été émise dès le moment où l'on a découvert qu'il portait à la fois une flavine et un hème comme groupes prosthétiques (2, 57). Depuis ce temps les différentes étapes du mécanisme de la réaction enzymatique qui permet le transfert des 2 électrons du L-lactate au cytochrome c ont été déchiffrées, et ces études ont effectivement confirmé l'hypothèse initiale. En effet les études effectuées ces dernières années par C. Capeillère, R. Bray, M. Iwatsubo et F. Labeyrie (28-30) ont clairement mis en évidence le fait que le flavocytochrome b_2 fonctionne tout d'abord comme une déshydrogénase à flavine : le L-lactate passant ses deux électrons à la flavine ; puis ensuite comme un cytochrome : la flavine redistribuant les électrons un par un aux groupes héminiques prosthétiques.

Cette association flavodéshydrogénase-cytochrome se retrouve dans plusieurs systèmes ; ainsi dans la chaine respiratoire de E. Coli (D-lactate déshydrogénase ⟶ cytochrome b)(73) ou dans les microsomes de foie de mammifère (NADH cytochrome b_5 réductase ⟶ cytochrome b_5)(74). Cependant le caractère particulier du flavocytochrome b_2 vient du fait que ces deux fonctions sont portées par la même molécule.

On pouvait alors se poser le problème suivant : ces deux fonctions sur le flavocytochrome b_2 sont-elles étroitement imbriquées ou bien pourrait-on arriver à les séparer ?

On sait que dans certains cas d'enzymes bifonctionnels (par exemple la DNA polymerase de E. coli) l'action des protéases peut permettre d'isoler les deux activités enzymatiques (69-70). Dans ces cas, et dans la mesure où les activités enzymatiques ne sont pas modifiées par la protéolyse on peut admettre que les structures tertiaires des deux fragments représentent des entités structurales indépendantes.

Qu'en est-t-il pour le flavocytochrome b_2 ? Le travail exposé ci-dessus a tenté en partie de répondre à ce problème.

L'étude de la structure du flavocytochrome b_2 en sous-unités selon les techniques de l'ultracentrifugation analytique a montré que chaque protomère était formé de deux sous-unités : α de poids moléculaire 33 000 - 36 000 et β de poids moléculaire 21 000 - 24 000. Le même résultat était atteint parallèlement par le groupe de F. Lederer (50) après séparation des chaines et analyse de leur contenu en acides aminés.

Dans le même temps il était démontré, parallèlement par Labeyrie et Baudras (65) et par Jacq et Lederer (53) que la forme initiale de l'enzyme ne contient qu'un seul type de chaine de 58 000 daltons et que la structure en deux sous-unités provient d'une protéolyse qui a lieu au cours de l'extraction et qui conduit à une forme encore active de l'enzyme. Ces mêmes auteurs ainsi que Naslin et al (66) démontraient qu'une région de la chaine polypeptidique est particulièrement sensible à l'action des protéases et suggéraient une structure biglobulaire du protomère.

La question logique qui se pose alors est de savoir si à chaque globule est associée une fonction différente.

Il est actuellement démontré que le globule α contient le site de l'hème. Dans le travail exposé ci-dessus nous avons montré comment on pouvait séparer les deux globules α et β et comment l'hème se refixait uniquement sur le globule α dans la proportion 1 hème/1 globule α . Une conclusion analogue avait d'ailleurs été tirée d'expériences tout à fait différentes effectuées par F. Lederer et A.M. Simon (50). Elles avaient démontré par analyses d'acides aminés que le noyau cytochromique b_2 qui contient le site de l'hème provenait de la chaine lourde . D'autres arguments avaient été également donnés par Naslin et al (66) à partir de l'analyse des fragments polypeptidiques obtenus pendant les premières étapes de la trypsinolyse du flavocytochrome b_2.

Quant au globule β , nous avons réussi à l'obtenir séparément, mais nous n'avons pu refixer la flavine sur ce globule seul. Nous avons observé au contraire que la flavine ne pouvait se refixer que sur le mélange des deux globules α et β . Il nous parait donc probable que le site de la flavine fait intervenir des acides aminés appartenant aux deux globules. A la question que nous nous

étions posée au début de cette discussion, à savoir si la protéolyse pouvait séparer les deux fonctions, flavodéshydrogénase et cytochrome, nos expériences n'ont pas permis d'apporter une réponse positive.

D'autres questions se posent encore, en particulier celles concernant la relation topologique entre la flavine et l'hème Sont-ils proches ou éloignés ?

J.L. Risler, M. Iwatsubo et O. Groudinsky (35-37) ont tenté de résoudre ce problème en particulier par des méthodes spectroscopiques. Ces méthodes n'ont généralement pas permis de mettre en évidence une interaction entre l'hème et la flavine. Cependant en dichroisme circulaire magnétique une bande présente seulement en présence de flavine pourrait correspondre à la bande d'absorption δ de l'hème plutôt qu'à une transition flavinique (37). Cette attribution impliquerait que les deux groupes prosthétiques sont très proches l'un de l'autre.

On pouvait penser que l'obtention d'un dérivé flavoprotéique privé d'hème pourrait révéler des interactions réciproques hème-flavine. Cependant bien au contraire, ce dérivé flavoprotéique semble posséder la fonction déshydrogénasique, apparemment inchangée par rapport au flavocytochrome b_2. L'enlèvement de l'hème ne modifie pas :

1) la valeur du K_m du complexe substrat-enzyme, c'est à dire l'affinité du L-lactate pour la flavine.

2) la vitesse de passage des électrons du substrat à la flavine.

3) le spectre dichroique circulaire de la flavine fixée à la protéine.

Toutes ces données, si elles n'impliquent pas que l'hème et la flavine soient éloignés l'un de l'autre, n'amènent en tout cas aucun argument positif en faveur de l'hypothèse selon laquelle ils seraient proches.

Par contre ce dérivé a apporté des informations sur le fait que, si la flavine peut être réoxydée directement par le ferricyanure dans le dérivé privé d'hème, la voie de réoxydation fonctionnelle dans le flavocytochrome b_2 est celle qui passe par l'hème.

On voit donc que bien des problèmes concernant le flavocytochrome b_2 ne sont pas encore résolus, en particulier :

1) le problème du site de la flavine sur la chaine polypeptidique. On peut espérer résoudre ce problème en fixant covalement sur la chaine un analogue de la flavine. Cependant actuellement un tel analogue n'a pas encore été fabriqué.

2) le problème des interactions entre l'hème et la flavine. La méthode qui pourra très certainement résoudre ce problème, ainsi que le précédent est la diffraction des rayons X à haute résolution. Cette étude représenterait bien sûr un travail de longue haleine. Cependant, actuellement les cristaux de flavocytochrome b_2 dont on dispose ne se prètent pas à l'analyse cristallographique ; ils sont trop petits et supportent mal l'irradiation par les rayons X. D'autre part ces cristaux sont ceux de l'enzyme sous sa forme protéolysée, et on ne sait pas exactement dans quelle mesure la protéolyse modifie la structure tertiaire de la chaine polypeptidique. Il semble préférable d'entreprendre l'analyse cristallographique sur la forme non protéolysée : soit sur l'enzyme physiologique, soit sur le flavocytochrome b_2 extrait de la levure Hansenula anomala. Notons que F.S. Mathews tente actuellement de cristalliser ce dernier flavocytochrome b_2.

D'autres questions concernant le flavocytochrome b_2 se posent qu'il sera plus difficile de résoudre :

1) La nature bifonctionnelle du flavocytochrome b_2 associée à sa structure biglobulaire telle qu'elle apparait après protéolyse limitée suggèrent que cette structure pourrait provenir d'une fusion de deux gènes. Un gène coderait pour un globule associé à la fonction déshydrogénase ; l'autre gène coderait pour l'autre globule associé à la fonction cytochromique. Nous disposons actuellement de peu d'informations pour dire qu'un tel mécanisme a pu se produire pour le flavocytochrome b_2.

Dans le cas d'enzyme bifonctionnel résultant d'une fusion de deux gènes comme celle réalisée par Yourno et al (71) chaque fonction enzymatique est portée par une structure tertiaire relativement indépendante (72). Pour le flavocytochrome b_2, si l'hème est porté par le globule α , les expériences effectuées semblent montrer que la flavine serait en fait portée par l'ensemble des deux globules α et β.

2) Une grande similitude de séquence a été trouvée entre le noyau cytochromique b_2 et le cytochrome b_5 extrait des microsomes de mammifères. La question se pose de savoir pourquoi ces noyaux cytochromiques provenant d'organismes si différents présentent de telles homologies. L'hypothèse selon laquelle ces deux protéines homologues proviendraient d'un gène ancestral commun et auraient été conservées au cours de l'évolution a été proposée (42)

Il serait extrêmement intéressant de continuer l'étude comparée des structures du flavocytochrome b_2 et du cytochrome b_5. On peut se demander en particulier s'il existe dans le cytochrome b_5 des régions hydrophobes correspondant aux régions du flavocytochrome b_2 jouant un rôle dans le contact entre les protomères.

Références bibliographiques hors articles

1 - Appleby, C.A. and Morton, R.K. (1954) Nature, 173, 749-753.
2 - Appleby, C.A. and Morton, R.K. (1959) Biochem. J., 71, 492-499.
3 - Boeri, E., Cutolo, E., Luzzati, M. and Tosi, L. (1955) Arch. Biochem. Biophys., 56, 487-499.
4 - Nygaard, A.P. (1960) Acta Chem. Scand. 14, 1843-1844.
5 - Gregolin, C. and Singer, T.P. (1962) Biochim. Biophys. Acta, 57, 410-412.
6 - Slonimski, P.P. and Tysarowski, W. (1958) C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris) 246, 1111-1114.
7 - Labeyrie, F., Slonimski, P.P. and Naslin, L. (1959) Biochim. Biophys. Acta 34, 262-265.
8 - Somlo, M. (1966) Bull. Soc. Chim. Biol. 48, 247-276.
9 - Nygaard, A.P. (1960) Biochim. Biophys. Acta, 40, 85-92.
10 - Nygaard, A.P. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1585-1588.
11 - Bernheim, F. (1928) Biochem. J. 22, 1178-
12 - Bach, S.J., Dixon, M. and Keilin, D. (1942) Nature, 149, 21-25.
13 - Slonimski, P.P., (1953) Formation des Enzymes Respiratoires chez la levure, (Masson, Paris).
14 - Somlo, M. (1965) Biochim. Biophys. Acta, 97, 183-201.
15 - Somlo, M. and Slonimski, P.P. (1966) Bull. Soc. Chim. Biol. 48 , 1221-1249.
16 - Nicholls, R.G., Atkinson, M.R., Burgoyne, L.A. and Symons, R.H. (1966) Biochim. Biophys. Acta, 122, 14-21.
17 - Pajot, P. and Claisse, M. (1974) Eur. J. Biochem. 49, 275-285.
18 - Monteilhet, C. and Risler, J.L. (1970) Eur. J. Biochem. 12, 165-169.
19 - Mével-Ninio, M. (1972) Eur. J. Biochem. 25, 254-261.
20 - Pajot, P. and Groudinsky, O. (1970) Eur. J. Biochem. 12, 158-164.
21 - Jacq, C. and Lederer, F. (1970) Eur. J. Biochem. 12, 154-157.
22 - Morton, R.K., Armstrong, J.McD. and Appleby, C.A. (1961) in "Haematin Enzymes" ed. by Falk, J.E., Lemberg, R., and Morton, R.K., Pergamon Press Inc. New York, p. 501-523.
23 - Hasegawa, H. and Ogura, Y. (1961) in "Haematin Enzymes" ed. by Falk, J.E., Lemberg, R. and Morton, R.K., Pergamon Press Inc, New York, p. 534-543.
24 - Baudras, A. (1965) Bull. Soc. Chim. Biol. 47, 1143-1175.
25 - Baudras, A. (1965) Bull. Soc. Chim. Biol. 47, 1177-1201.

26 - Iwatsubo,M. and di Franco, A. (1965) Bull. Soc. Chim. Biol. 47, 891-910.

27 - Forestier, J.P. and Baudras, A. (1971) in "Flavins and Flavoproteins" ed. by Kamin, H., University Park Press, Baltimore, p.599-605.

28 - Capeillère-Blandin, C. (1974) Thèse de Doctorat d'Etat de l'Université de Paris Sud - Orsay.

29 - Bray, R.C., Lowe, D.J., Capeillère-Blandin, C. and Fielden, E.M. (1973) Biochem. Soc. Transactions 1, 1067-1072.

30 - Capeillère-Blandin, C., Bray, R.C., Iwatsubo, M. and Labeyrie, F. (1975) accepté à Eur. J. Biochem.

31 - Hiromi, K. and Sturtevant, J.M. (1965) J. Biol. Chem. 240, 4662-4668.

32 - Singer, T.P. and Kearney, E.B. (1954) in "The Proteins", ed. by Neurath, H., and Bailey, K. vol. 2a, Chap. 13-IV, Academic Press, New York.

33 - Bray, R.C., Palmer, G. and Beinert, H. (1964) J. Biol. Chem. 239, 2667-2676.

34 - Dervatanian, D.V., Veeger, C., Orme-Johnson, W.H., and Beinert, H. (1969) Biochim. Biophys. Acta, 191, 22-37.

35 - Risler, J.L. (1971) Biochemisty, 10, 2664-2669.

36 - Iwatsubo, M. and Risler, J.L. (1969) Eur. J. Biochem. 9, 280-285.

37 - Risler, J.L. and Groudinsky, O. (1973) Eur. J. Biochem. 35, 201-205.

38 - Groudinsky, O. (1972) Thèse de Doctorat d'Etat de l'Université de Paris VI.

39 - Groudinsky, O. (1971) Eur. J. Biochem. 18, 480-484.

40 - Watari, H., Groudinsky, O., and Labeyrie, F. (1967) Biochim. Biophys. Acta 131, 592-594.

41 - Keller, R., Groudinsky, O. and Wuthrich, K. (1973) Biochim. Biophys. Acta 328, 233-238.

42 - Guiard, B., Groudinsky, O. and Lederer, F. (1974) Proc. Natl. Acad, Sci. U.S.A. 71, 2539-2543.

43 - Armstrong, J. Mc D., Coates, J.H., and Morton, R.K. (1963) Biochem. J. 86, 136-145.

44 - Appleby, C.A. and Morton, R.K.(1959) Biochem. J. 73, 539-550.

45 - Labeyrie, F., di Franco, A., Iwatsubo, M., and Baudras, A. (1967) Biochemistry 6, 1791-1797.

46 - Labeyrie, F., Groudinsky, O., Jacquot-Armand, Y., and Naslin, L. (1966) Biochim. Biophys. Acta, 128, 492-503.

47 - Appleby, C.A., Morton, R.K. and Symmonds, D.H. (1960) Biochem. J. 75, 72-

48 - Yphantis, D.A. (1964) Biochemistry, 3, 297-317.

49 - Baudras, A., and Labeyrie, F. (1968) in "Structure and Functions of cytochromes"(ed. by K. Okunuki, M. Kamen, I. Sekuzu) University Park Press, Baltimore) p. 601.

50 - Lederer, F., and Simon, A.M. (1971) Eur. J. Biochem. 20, 469-474.
51 - Shapiro, A.L., Vinuela, E., Maizel, J.V.Jr. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815-820.
52 - Weber, K. and Osborn, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406-4412.
53 - Lederer, F. and Jacq, C. (1971) Eur. J. Biochem. 20, 475-481.
54 - Itagaki, E., Palmer, G. and Hager, L. (1967) J. Biol. Chem. 242, 2272-2277.
55 - Strittmatter, P. (1960) J. Biol. Chem. 235, 2492-2497.
56 - Rossi-Fanelli, A., and Antonini, E. (1960) J. Biol. Chem. 235, PC4.
57 - Morton, R.K., and Shepley, K. (1963) Biochem. Zeitschrift, 338, 122-139.
58 - Morton, R.K. (1961) Nature 192, 727-731.
59 - Baudras, A. (1962) Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 310-314.
60 - Spyridakis, A., Naslin, L. and Labeyrie, F. (1971) Eur. J. Biochem. 53, 195-205.
61 - Baudras, A. (1965) Bull. Soc. Chim. Biol. 47, 1449-1466.
62 - Ghisla, S., Massey, V., Lhoste, J.M. and Mayhew, S.G. (1974) Biochemistry, 13, 589-597.
63 - Iwatsubo, M., Baudras, A., di Franco, A., Capeillère, C. and Labeyrie, F. (1968) in "Flavins and Flavoproteins" ed. by Yagi, K. Univ. of Tokyo Press, Univ. Park. Press, p. 41-58.
64 - Lederer, F. (1974) Eur. J. Biol. 46, 393-399.
65 - Labeyrie, F. and Baudras, A. (1972) Eur. J. Biochem. 25, 33-40.
66 - Naslin, L., Spyridakis, A. and Labeyrie, F. (1973) Eur. J. Biochem. 34,268-283.
67 - Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
68 - Labeyrie, F., résultats non publiés.
69 - Setlow, P. and Kornberg, A. (1972) J. Biol. Chem. 247, 232-240.
70 - Klenow, H., Overgaard-Hansen, K. and Patkar, S.A. (1971) Eur. J. Biochem. 22, 371-381.
71 - Yourno, J., Kohno, T. and Roth, J.R. (1970) Nature, N.B. 228, 820- 824
72 - Aloj, S., Bruni, C.B., Edelhoch, H. and Rechler, M.M. (1973) J. Biol. Chem. 248, 5880-5886.
73 - Strittmatter, P. (1966) in "Flavins and flavoproteins". E.C. Slater ed. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, p. 325-340
74 - Smith. L. (1968) in "Biological oxidations. T.P. Singer ed. Interscience Publishers, New York. p. 55-122.

ROLE ESSENTIEL DE l'ATPase MEMBRANAIRE DE E.coli EN ANAEROBIOSE COMME FACTEUR DE COUPLAGE ENERGETIQUE

I N T R O D U C T I O N

Les membranes biologiques sont reconnues depuis très longtemps comme étant le site de processus cellulaires très importants comme la phosphorylation oxydative, la photophosphorylation, le transport de métabolites, la motilité, la division cellulaire etc... Ces fonctions cellulaires font l'objet depuis de nombreuses années d'études intensives. Cependant jusqu'à présent les mécanismes de ces fonctions ne sont toujours que très partiellement compris. Ceci est dû en grande partie aux difficultés techniques rencontrées pour solubiliser les protéines membranaires. En effet dans les bactéries aussi bien que dans les mitochondries et dans d'autres organelles les systèmes enzymatiques qui effectuent les fonctions membranaires ne sont pas simplement accrochés à la membrane mais sont organisés à l'intérieur de celle-ci dans un environnement hydrophobe. Il est extrêmement difficile de solubiliser chaque constituant d'un système enzymatique puis de reconstituer ce système in vitro.

La plupart des fonctions cellulaires effectuées par les membranes réclament de l'énergie et on sait depuis longtemps que celles-ci sont capables d'utiliser différentes formes d'énergie : énergie des électrons, énergie lumineuse, énergie de l'ATP. Elles fonctionnent en quelque sorte comme des convertisseurs d'énergie.

Dans le travail présenté ici nous avons abordé le problème de la conversion de l'énergie par les membranes en étudiant quelques fonctions cellulaires liées à la membrane de E. coli ; principalement le transport actif d'aminoacides, puis d'une manière très préliminaire la synthèse du DNA. Il nous parait important pour l'interprétation de nos résultats d'exposer quelques idées généralement admises quant à la production et l'utilisation de l'énergie dans les membranes. Ces processus ont été beaucoup plus étudiés et sont donc mieux compris dans les mitochondries que dans les bactéries, mais cependant les résultats acquis pour les mitochondries sont d'une aide précieuse pour comprendre les membranes bactériennes. Aussi, bien que nous ayons travaillé sur E. coli nous parlerons aussi dans cette introduction des phénomènes de conversion d'énergie dans les mitochondries.

I - CONVERSION DE L'ENERGIE DANS LES MITOCHONDRIES

L'oxydation de nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH), de succinate ou d'autres donneurs d'électrons est catalysée par une chaine multienzymatique associée à la membrane interne des mitochondries (1). Cette chaine multienzymatique contient à la fois des porteurs d'hydrogène (flavoprotéines et quinones) et des porteurs d'électrons (cytochromes) (1-5). L'ensemble des réactions de la chaine respiratoire est exergonique et est couplée avec la synthèse endergonique de molécules d'ATP : 3 par moles de NADH ou 2 par moles de succinate (1). Le couplage de la synthèse d'ATP aux réactions d'oxydo-réduction a lieu en des sites spécifiques de la chaine. Ce couplage fait intervenir un certain nombre de protéines appelées collectivement "facteurs de couplage" (2, 6, 7). L'une d'elle possède une activité ATPase.

La chaine respiratoire permet la synthèse endergonique de l'ATP mais en fait elle est couplée également à d'autres réactions endergoniques. Par exemple à une éjection de protons de la face interne à la face externe de la mitochondrie (8-10). (On verra plus loin l'importance de ce phénomène, puisque d'après l'hypothèse chemiosmotique de Mitchell (3, 11) la force motrice des protons permettrait d'effectuer non seulement la synthèse de l'ATP (3, 12) mais aussi le transport de métabolite (13-15) à l'intérieur de la mitochondrie). La chaine respiratoire peut être reliée également à une accumulation d'ions (16) et de substrats (17-18) contre un gradient de concentration, ainsi qu'à la réaction de transhydrogénation, c'est à dire la réduction de NADP par NADH (5,19,20).

Il est reconnu que dans les mitochondries les fonctions nécessitant de l'énergie peuvent être en général effectuées selon plusieurs voies. Ainsi un transport d'ions, ou bien la réaction de transhydrogénation peuvent être couplés soit avec la chaine respiratoire (5, 16) soit avec l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP (21, 22). D'autre part il a été démontré qu'un gradient de pH imposé à des mitochondries entrainait la synthèse d'ATP (23). (Les mêmes résultats étaient obtenus avec des chloroplastes (24)).

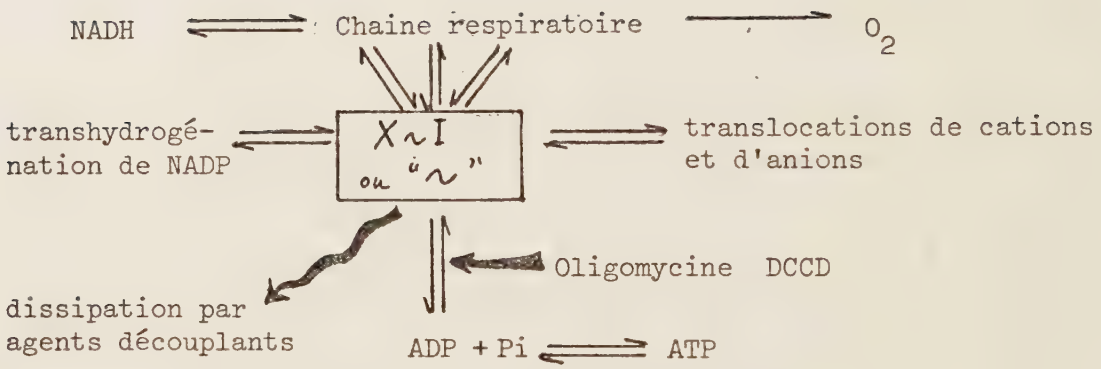


Schéma I : voies de conservation et transformation de l'énergie dans les mitochondries. (D'après Harold (26)).

Il semble qu'il y ait tout un réseau de réactions réversibles liant la chaine d'oxydo-réduction, l'ATP et les gradients de concentration d'ions. Ce réseau de réactions a pu être déchiffré à l'aide d'inhibiteurs spécifiques des réactions de transfert d'énergie. L'oligomycine, la rutamycine, le DCCD inhibent à la fois la synthèse d'ATP et l'hydrolyse de l'ATP dans les mitochondries (2, 25). Ces inhibiteurs bloquent aussi la réaction de transhydrogénation (21) et le transport d'ions dépendants de l'ATP ; cependant ils n'affectent pas ces réactions quand un substrat oxydable sert de donneur d'énergie (5, 20). Ces résultats ont été à la base de l'hypothèse selon laquelle existerait une autre forme de réserve d'énergie pouvant être créée grâce à l'oxydo-réduction, l'ATP ou même un gradient d'ions et qui serait le lien entre les diverses fonctions dépendantes en énergie (4, 5, 20).

Si les différentes équipes travaillant sur la conversion de l'énergie dans les membranes biologiques sont à peu près toutes d'accord pour admettre l'hypothèse de l'existence d'un intermédiaire énergisé, par contre la nature de cet intermédiaire est extrêmement controversée. Sa position centrale est représentée dans le schéma I reproduit d'un article de Harold (26).

Hypothèses concernant la nature de l'intermédiaire énergisé

1/ Hypothèse d'un couplage chimique

Certains chercheurs (en particulier Slater (20, 27) et Storey (28) ont formulé l'hypothèse selon laquelle l'énergie libérée par la chaine respiratoire serait conservée sous la forme d'un intermédiaire de haute énergie, selon la réaction : $A_{red} + B_{ox} + I \rightleftharpoons A_{ox} \sim I + B_{red}$. Cependant on n'a jamais pu isoler cet intermédiaire de la phosphorylation oxydative et d'autres hypothèses ont été envisagées.

2/ Hypothèse d'un couplage conformationnel

Par analogie avec ce qui se passe dans le muscle qui convertit l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP en travail mécanique, certains auteurs ont pensé qu'un phénomène analogue mais fonctionnant en sens inverse pourrait expliquer la synthèse de l'ATP dans la mitochondrie (29-33). L'énergie libérée par la chaine respiratoire serait conservée sous la forme d'un état contraint, métastable

et riche en énergie d'éléments de la membrane mitochondriale. En présence d'ADP et de P_i cet état se relacherait avec la synthèse simultanée d'ATP. Des clichés de microscopie électronique ont montré en effet des changements structuraux très importants suivant l'état métabolique de la mitochondrie (30). Cependant il est difficile de prouver que ces changements conformationnels sont la cause plutôt que la conséquence de la synthèse de l'ATP.

3/ Hypothèse chemiosmotique

Elle a été émise par Peter Mitchell pour la première fois en 1961 (11) puis développée avec beaucoup de détails (2, 4, 5, 13, 34).

L'hypothèse chemiosmotique repose sur les postulats suivants :
a) la membrane mitochondriale interne est imperméable à la plupart des ions, parmi lesquels les ions H^+ et OH^-. Il en résulte qu'elle a une faible conductivité ionique.
b) l'oxydation d'un substrat entraine la translocation de protons qui sont éjectés de la face interne à la face externe de la membrane (5). L'oxydation d'un substrat engendre donc un gradient de pH et un potentiel électrique de part et d'autre de la membrane.

La membrane interne mitochondriale contient une ATPase. Selon l'hypothèse chemiosmotique l'ATPase catalyse la synthèse de l'ATP simultanément avec la translocation de protons. La force motrice des protons serait le facteur commun responsable non seulement de la synthèse d'ATP mais aussi des autres fonctions réclamant de l'énergie comme le transport des cations, anions et substrats.

Il est maintenant reconnu que la membrane mitochondriale est imperméable aux protons (35). Une conséquence de la théorie de Mitchell est le fait que les préparations membranaires qui effectuent la phosphorylation oxydative doivent être fermées, ceci afin de permettre l'établissement d'un gradient de protons. Les travaux de Racker et coll. montrent qu'il en serait bien ainsi. En effet, Racker et coll. ont réussi à dissocier les composants de la chaine respiratoire et des facteurs de couplage, puis à les réassembler (2, 36, 37). Ils ont observé que la récupération de la phosphorylation oxydative est toujours associée avec la reconstitution de vésicules fermées.

II - CONVERSION DE L'ENERGIE DANS LES BACTERIES

Les bactéries sont profondément différentes des mitochondries dans leur structure aussi bien que dans leurs fonctions. Aussi est-il hasardeux d'extrapoler les résultats obtenus pour les mitochondries aux bactéries. Cependant il est vraisemblable que les principes de base du fonctionnement des membranes biologiques vont se retrouver dans les mitochondries aussi bien que dans les bactéries.

La membrane cytoplasmique des bactéries effectue diverses fonctions qui dans les cellules eukaryotes sont réalisées par des organelles spécialisées comme les mitochondries par exemple. Elle porte les catalyseurs de la chaine respiratoire et de la phosphorylation oxydative. Elle contrôle le transport de métabolites et d'ions entre le milieu extérieur et le cytoplasme. Elle effectue de plus des fonctions dépendantes en énergie qui lui sont propres comme la motilité bactérienne. Un autre point commun entre les membranes bactériennes et mitochondriales est la présence sur la surface interne de la membrane plasmique de particules tigées (38, 39). De telles structures semblent contenir la partie soluble du complexe ATPasique activé par Ca^{2+} et Mg^{2+} et font partie de l'appareil de phosphorylation oxydative (39, 40).

La phosphorylation oxydative

Dans la chaine respiratoire des bactéries comme dans celle des mitochondries les électrons provenant de substrats réducteurs tels que le NADH ou le succinate sont transportés jusqu'à l'oxygène par une chaine multienzymatique contenant des transporteurs d'électrons et des transporteurs d'hydrogène. La différence essentielle entre les chaines respiratoires bactériennes et mitochondriales est que les chaines respiratoires bactériennes sont moins spécifiques quant au donneur d'électron initial et à l'accepteur terminal (26). Elles peuvent oxyder une plus grande variété de substrats que les mitochondries ; parfois elles peuvent utiliser le sulfate ou le nitrate comme accepteur terminal d'électrons à la place de l'oxygène (40-42). Chez E. coli en aérobiose la phosphorylation oxydative fournit une grande part de l'ATP. Le nombre de sites de couplage le long de la chaine respiratoire varie suivant les auteurs. Selon certains (43, 44) 3 moles d'ATP seraient produites

pour chaque molécule de NADH oxydée. D'autres études (45, 46) suggèrent que seulement deux sites de conservation de l'énergie seraient associés avec la chaine respiratoire.

Un caractère commun à toutes les préparations bactériennes effectuant la phosphorylation oxydative est le fait qu'elles possèdent une activité ATPase (38, 47-49). Cette ATPase est activée par Mg^{2+} ou Ca^{2+} (50). Cet enzyme est l'analogue de l'ATPase des mitochondries et des chloroplastes et catalyse la dernière étape de l'oxydation phosphorylative (38-40, 47, 51).

Une évidence directe de la participation de l'ATPase à la phosphorylation oxydative a été fournie récemment par Butlin, Cox et Gibson qui ont isolé des mutants de E. coli incapables de coupler la phosphorylation à l'oxydation (52-57). Les fractions membranaires de ce mutant ont une activité ATPase très faible.

Comment s'effectue le couplage de l'énergie entre la chaine respiratoire et la synthèse d'ATP ? De nombreuses équipes pensent que ce couplage se ferait dans les bactéries comme dans les mitochondries par un intermédiaire non phosphorylé riche en énergie, selon le schéma I de Harold (26). Une évidence de l'existence de cet intermédiaire riche en énergie vient des résultats concernant la réaction de transhydrogénation, c'est à dire réduction de NADP par NADH (58). Des particules membranaires de E. coli peuvent coupler la transhydrogénation soit à l'oxydation du succinate, soit à l'hydrolyse d'ATP (53, 59). Quand l'ATP sert de donneur d'énergie la réaction est inhibée par les agents découplants, mais pas par les inhibiteurs qui agissent au niveau de la chaine respiratoire (53

Le mécanisme de couplage de l'énergie ainsi que la nature de l'intermédiaire énergisé sont toujours controversés. Cependant des études récentes suggèrent que dans les bactéries comme dans les mitochondries la phosphorylation oxydative ainsi que les fonctions comme le transport actif d'amino acides et de sucres nécessitent la formation d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane (60-62). Mitchell et coll. ont montré que des protons sont expulsés lors de l'hydrolyse de l'ATP par des vésicules membranaires de E. coli (63). D'autre part, d'après les travaux de Harold et coll. la force motrice des protons pourrait être remplacée par un potentiel électrique (celui crée par exemple par la sortie d'ions K^+ de la bactérie) en vue d'effectuer l'accumulation de

métabolites dans des vésicules membranaires de E. coli (64, 65).

III - PROBLEME ETUDIE

Dans le travail présenté dans cet exposé nous avons étudié le problème de la conversion de l'énergie dans la membrane de E. coli. Ce problème a été abordé en utilisant des mutants dans lesquels certains processus énergétiques sont bloqués. Des mutants de E. coli analogues à celui de Butlin et coll(52) n'effectuant pas la phosphorylation oxydative et ayant une activité ATPasique très réduite sont favorables à une telle étude.

1/ Nous avons utilisé un tel mutant pour étudier sur des cellules entières le problème du transport actif d'amino acides et de la réplication du DNA. Des expériences parallèles ont été faites sur le type sauvage et sur le mutant ATPase$^-$ dans des conditions à la fois aérobiques et anaérobiques.

Nos résultats indiquent que les cellules sauvages de E. coli peuvent utiliser l'ATP comme donneur d'énergie lorsque la chaine respiratoire ne fonctionne pas, en anaérobiose. Dans les mutants qui n'ont pas d'ATPase les fonctions nécessitant un apport énergétique comme le transport actif d'amino acides ne peuvent pas être effectuées par l'utilisation de l'ATP. Par contre ce transport actif peut être effectué en aérobiose par l'intermédiaire de l'énergie délivrée par la chaine respiratoire. Nos résultats concernant le transport actif peuvent s'interpréter selon le schéma (I) de Harold (26) et ils tendent à montrer l'existence de deux voies différentes d'utilisation de l'énergie pouvant être reliées entre elles par un intermédiaire commun énergisé.

2/ D'autre part, nous avons étudié la phosphorylation oxydative et le transport des amino acides sur des préparations membranaires. Depuis déjà plusieurs années des particules membranaires phosphorylantes ont été préparées à partir de différentes espèces bactériennes (40, 58). Signalons que l'oxydation phosphorylative des particules bactériennes a une efficacité très faible puisque les P/O obtenus sont généralement inférieurs à 1 (40, 66). Cependant il est maintenant reconnu que les cellules bactériennes intactes ont des P/O comparables à ceux des organelles de cellules eukaryotes mitochondries ou chloroplastes (43, 44, 46) ; aussi pense-t-on

que les P/O très faibles mesurés sur les préparations membranaires sont dûs à un endommagement structural, ou à la perte d'un composant essentiel à la phosphorylation oxydative

Nous avons étudié plusieurs types de préparations membranaires: des vésicules phosphorylantes et des vésicules non phosphorylantes préparées selon Kaback (67). Les vésicules de Kaback ont fait l'objet d'études approfondies en ce qui concerne leur préparation, homogénéité, propriétés physiques et biologiques (67, 68). Elles n'effectuent pas la phosphorylation oxydative. Nous avons essayé de déterminer si ceci était dû à la perte d'un facteur essentiel ou bien à leur topologie.

3/ D'autre part, en travaillant cette fois sur des cellules entières nous avons étudié la synthèse du DNA chez E. coli.
Certains chercheurs (69-71) considèrent en effet que l'initiation de la synthèse du DNA a lieu sur la membrane bactérienne et doit réclamer de l'énergie. L'ATPase étant un système enzymatique membranaire impliqué dans le couplage énergétique, nous avons étudié s'il avait un rôle dans la synthèse du DNA.

Nos expériences vérifient l'hypothèse selon laquelle la chaine respiratoire de E. coli permet non seulement la synthèse de l'ATP, mais aussi d'autres fonctions membranaires réclamant de l'énergie, par exemple le transport de substrats. Ce qui est important c'est le fait que ces fonctions ne nécessitent pas tout d'abord la synthèse d'ATP. Inversement de l'ATP exogène mais intracellulaire peut être utilisé par l'intermédiaire de l'ATPase pour effectuer ces fonctions dépendantes en énergie.

C H A P I T R E I

MISE EN EVIDENCE DU ROLE ESSENTIEL DE L'ATPase DANS LA CROISSANCE ANAEROBIQUE ET DANS LE TRANSPORT ANAEROBIQUE D'AMINO-ACIDES PAR L'ETUDE DE MUTANTS DE E.COLI DEPOURVUS D'ATPase.

Ce n'est que récemment que des études sur la phosphorylation oxydative ont été faites en utilisant E. coli (52-57). Cet organisme est particulièrement approprié pour combiner des études biochimiques et génétiques. En effet, il a été intensivement étudié du point de vue génétique, et les manipulations génétiques sur cet organisme sont relativement aisées.

Des mutants de E. coli incapables de coupler la respiration avec la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) ont été isolés pour la première fois par Butlin, Cox et Gibson d'une part (52) et par Kanner et Gutnick (72) d'autre part ; ces derniers auteurs pour isoler de tels mutants ont supposé que les mutants dépourvus de phosphorylation oxydative pourraient être rendus résistants à l'antibiotique néomycine, car ils ne produiraient pas assez d'énergie pour pouvoir concentrer un antibiotique. D'autre part, de tels mutants doivent pouvoir pousser sur du glucose mais pas sur un quelconque intermédiaire du cycle de Krebs. En effet sur celui-ci ils ne pourraient synthétiser l'ATP nécessaire à leur croissance alors que sur glucose leur ATP serait produit par glycolyse. Aussi, parmi 500 colonies néomycine résistantes, ont-ils sélectionné 14 colonies qui pouvaient pousser sur du glucose mais pas sur du succinate ou du D-lactate comme source de carbone. Parmi celles-ci ils isolèrent un mutant ne possèdant pas d'activité ATPase.

Cox et Gibson ont isolé un mutant affecté quant à la phosphorylation oxydative selon une autre méthode (52, 73, 74). Ils s'attendaient à ce qu'un tel mutant ait un rendement de croissance peu élevé puisqu'il fournirait moins d'énergie qu'une souche normale. Parmi des mutants streptomycine résistants ne pouvant pousser sur succinate, mais dont la chaine respiratoire ne semblait pas affectée ils ont sélectionné ceux qui avaient un faible rendement de croissance. Parmi ceux-ci ils isolèrent deux mutants dont le P/O était très faible, < 0.001 ; alors que pour une souche normale les P/O obtenus par ces auteurs sont de 0.1 - 0.2.

L'étude génétique de ces mutants montre qu'ils contiennent une mutation sur un gène (appelé unc A) situé à 73.5 minutes sur le chromosome de E. coli et cotransductible avec le gène ilv. Gibson et coll. ont entrepris une étude génético-biochimique de ces mutants qu'ils ont appelé unc$^-$ (uncoupled)(52-56).

Signalons qu'après les groupes de Gibson et de Gutnick de nombreux laboratoires ont isolé et étudient des mutants de E. coli dans lesquels l'ATPase est altérée (62, 65, 75-78).

Des mutants ne possèdant pas d'activité ATPase ont été préparés dans le laboratoire de R. Valentine selon la méthode de Kanner et Gutnick.

Le mutant utilisé principalement dans notre travail a été dénommé unc-17. Les propriétés de ce mutant qui le caractérisent comme un mutant unc A sont les suivantes : il possède une activité ATPase non détectable ; l'énergie de la chaine respiratoire est découplée de la synthèse de l'ATP ; la mutation est localisée près de l'opéron biosynthétique ilv ; il ne pousse par en anaérobiose ; il ne pousse pas sur du succinate. La souche fournit des révertants qui peuvent utiliser le succinate avec une fréquence de 10^{-6}, ce qui laisse à penser qu'une mutation ponctuelle est responsable du phénotype unc.

Nous avons abordé le problème du rôle de l'ATPase dans le transport actif d'amino-acides dans le mutant unc 17. Au moment où nous avons débuté cette étude le problème du transport actif dans des mutants unc⁻ de E. coli avait déjà été abordé, par le groupe de Simoni (75) et par celui de Kaback (79) mais seulement dans des conditions aérobiques. Les résultats obtenus par ces deux groupes quant au transport actif de proline et d'alanine par des vésicules membranaires de mutants unc⁻ étaient différents. Alors que les vésicules membranaires du mutant de Kaback gardaient la capacité d'effectuer le transport actif en aérobie, les vésicules membranaires du mutant de Simoni avaient perdu cette capacité. Ces résultats n'étaient pas expliqués et nécessitaient une analyse détaillée du rôle de l'ATPase dans le transport actif.

Nous avons comparé les capacités de transport actif de cellules entières de souches sauvages et de mutants dans des conditions aérobiques et anaérobiques.

Nous avons d'abord trouvé que les mutants déficients en ATPase ne pouvaient pousser anaérobiquement sur du glucose comme source de carbone. Notons que ce n'est qu'après des observations répétées que nous avons pu mettre ce résultat en évidence. En effet des révertants apparaissent dans le milieu du culture lorsque l'incubation des bactéries inoculées est trop longue.

D'autre part, nous avons montré que le transport actif anaérobique ainsi que la croissance anaérobique bloqués dans le mutant unc-17 sont restaurés par addition de nitrate dans le milieu. Ceci montrerait qu'une respiration anaérobique, avec NO_3^- comme accepteur terminal des électrons, fournit l'énergie nécessaire pour les fonctions telles que le transport actif et la croissance. Cependant ces deux processus sont alors beaucoup plus lents que dans le fonctionnement aérobique avec O_2.

Reprinted from

Biochimica et Biophysica Acta, 314 (1973) 267–275

© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam – Printed in The Netherlands

BBA 46599

ESSENTIAL ROLE OF MEMBRANE ATPase OR COUPLING FACTOR FOR ANAEROBIC GROWTH AND ANAEROBIC ACTIVE TRANSPORT IN *ESCHERICHIA COLI*

T. H. YAMAMOTO, M. MÉVEL-NINIO and R. C. VALENTINE

Department of Chemistry, University of California, San Diego, La Jolla, Calif. 92037 (U.S.A.)

(Received April 2nd, 1973)

SUMMARY

Mutants of *Escherichia coli* defective in coupling electron transport to synthesis of ATP (*unc*$^-$) were isolated and screened for Mg^{2+}-ATPase activity using a rapid and sensitive Millipore filtration assay. An episome (F'16) carrying ATPase genes was used to map the *unc*$^-$ mutations near the *ilv* (isoleucine–valine) operon. Mutants missing membrane ATPase activity do not multiply anaerobically on glucose as energy source unless supplied with exogenous electron acceptors such as NO_3^-. Likewise, in the absence of exogenous electron acceptors anaerobic active transport of proline is blocked. These observations suggest that membrane ATPase has an essential role in membrane functions linked to glycolysis and thus may play an important role in energy conversion in the anaerobic membrane.

INTRODUCTION

Bacterial membranes in general are now recognized as sites for essential cellular processes such as respiration coupled to oxidative phosphorylation, photophosphorylation, and active transport[1]. In recent years the biochemistry of bacterial membrane function has been studied in considerable detail. However, relatively little is known regarding the genetic basis of membrane functions such as oxidative phosphorylation in bacteria. Butlin *et al.*[2] have recently started a biochemical–genetical study of a class of mutants defective in oxidative phosphorylation for which they suggest the term *unc*$^-$ (uncoupled). The genetic lesion was mapped on the *Escherichia coli* chromosome near the *ilv* operon. These mutants produce little if any membrane bound coupling factor activity (Mg^{2+}-ATPase). Butlin *et al.*[2] conclude that coupling factor activity is essential for oxidative phosphorylation. Respiratory linked active transport of amino acids was found to occur at normal levels[3] in the *unc*$^-$ mutant of Butlin *et al.*[2], but in reduced levels in the case of an *unc*$^-$ mutant isolated by Simoni and Shallenberger[4]. Schairer and Haddock[5] have shown that β-galactoside accumulation in whole cells of *unc*$^-$ strains is abolished by respiratory poisons, leading to their conclusion that ATPase activity is necessary for nonrespiratory driven β-galactoside accumulation. Our studies with ATPase defective mutants show that membrane-associated ATPase activity is also essential for anaerobic growth on glucose and

that ATPase negative mutants are blocked in active transport of proline under anaerobic conditions.

MATERIALS AND METHODS

Unc⁻ mutants

Spontaneous *unc⁻* mutants of *E. coli* K12 (W3110), F⁻, were isolated using the neomycin selection procedure of Kanner and Gutnick[6]. Several mutants were also isolated using streptomycin (SM) sulfate (20 μg/ml) in place of neomycin sulfate. The SM^r strains were resistant to neomycin and had other properties similar to the neomycin resistant strains. Mutants were maintained aerobically on L-broth agar plates[7] or L-broth supplemented with 0.5% glucose. Starter liquid cultures were inoculated with colonies from L-broth plates and were grown in flasks of L-broth or minimal medium using a shaker bath at 37 °C. No more than one serial transfer was made from these starter flasks because of accumulation of spontaneous wild type revertants as described below.

Anaerobic growth experiments

Fresh L-broth cultures were started each day using as inoculum colonies from L-broth plates. Exponentially growing cells (0.5 ml) were used to inoculate screw cap tubes which were completely filled with L-broth supplemented with 0.5% glucose; no attempt was made to remove dissolved oxygen prior to inoculation. This may account for the small amount of growth observed with ATPase⁻ mutants (see below). Incubation was at 37 °C. Growth was measured using a Klett colorimeter. Spontaneous revertants (*unc⁻*→*unc⁺*) present at the end of the experiment were tested by streaking a sample of cells on succinate plates. If reversion of the culture were suspected, samples were assayed for ATPase activity using the Millipore filter assay as described below.

Episomes carrying ATPase genes

A series of strains harboring various F′-*ilv* episomes, kindly supplied by Dr B. J. Bachmann of Yale University, were used as presumptive F′ donors of ATPase genes. An *unc⁻* recipient strain, unable to utilize succinate as energy source, was cross-streaked on minimal-succinate plates against the series of presumptive F′ donors of ATPase, which are multiple auxotrophs unable to multiply on the succinate plates. Confluent colonies appearing at the point of the cross-streak of donor and recipient were scored as presumptive evidence of F′-mediated transfer of ATPase genes. The presence of the F-factor in newly sired *unc⁺* males, an indication of F′ rather than Hfr transfer of ATPase, was monitored by testing *unc⁺* recombinants for sensitivity to the male phages f2 and Qβ or for donor ability of the F′-*ilv* episome. Quantitative mating of liquid cultures for transfer of ATPase was by standard procedures[7].

Assay of membrane-bound ATPase activity

A modification of the ATPase assay procedure of Evans[8] was used. ATPase reaction mixtures contained, in a final volume of 0.2 ml, 3 μmoles ATP adjusted to pH 7.0 with dilute NaOH, 20 μmoles Tris–HCl buffer at pH 9.5, and 1.0 μmole $MgCl_2$. The ATPase reaction was initiated by addition of enzyme and terminated,

after 30 min incubation at 37 °C in a water bath, by addition of 0.05 ml of 24% trichloroacetic acid and 1.75 ml $FeSO_4$ reagent. If necessary, denatured protein was removed at this stage by centrifugation for 5 min at 12000 × *g* in a Sorvall centrifuge. Inorganic phosphate was determined by a modification of the Fiske and SubbaRow[9] procedure as described by Shapiro and Stadtman[10] using a Gilford 3000 spectrophotometer for color analysis. Protein was determined by the procedure of Lowry *et al.*[11] with bovine albumin as standard.

For screening large numbers of presumptive ATPase$^-$ mutants a rapid Millipore membrane filtration assay was developed. Suitable amounts of cells (*e.g.* approx. $5 \cdot 10^7$ cells) were transferred to a bank of Millipore filters with each Millipore funnel containing approx. 10 ml of lysozyme solution composed of 20 μg/ml lysozyme, 0.15 M Tris–HCl buffer at pH 6.5, 0.6 M sucrose, 1.0 mM EDTA[8]. After 10 min of incubation at 25 °C for partial cell wall digestion the cells were collected on cellulose nitrate membrane filters (approx. 4500 Å pore size) and washed using about 10 ml of Mg^{2+}–Tris solution containing 0.02 M Tris buffer at pH 7.5, 1.0 mM $MgCl_2$ (ref. 8); reagents contained in plastic squeeze bottles are convenient for these steps. The filter pads were removed to 5-ml test tubes containing the assay reagents; a small glass rod was used to immerse the disks in assay reagent. Release of inorganic phosphate was analyzed as above.

Uptake of proline by whole cells

The cells were grown on Davis' glucose salts medium[7]. L-broth (0.2 ml/10 ml) was routinely added to culture media to increase the growth of *E. coli* 3110. Nitrate-grown cells were cultured anaerobically (filled stationary flasks) in similar medium supplemented with 0.2% KNO_3. For uptake experiments cells were suspended in buffer solution (50 mM potassium phosphate at pH 7.5, 0.2% $(NH_4)_2SO_4$ and 0.01% $MgSO_4$) to a density equivalent to a Klett reading (540 mm filter) of 800 (about 5 mg dry weight/ml). Each transport incubation mixture contained 0.5 ml cells, 5 ml buffer solution, and glucose to a final concentration of 0.1%. The cells were preincubated for 15 min at 25 °C; radioactive [^{14}C]proline (251 Ci/mole, New England Nuclear) was diluted in unlabeled proline and added to a final concentration of 50 μM. Samples of 0.5 ml (about 0.1 mg dry weight) were removed at each time point, filtered on Millipore filters (0.45 μm) and washed three times with 1 ml of salts solution, all at 25 °C. The filters were dried and counted in toluene liquid scintillation fluid. For anaerobic active transport experiments cell samples were placed in 10-ml flasks fitted with rubber serum stoppers, flushed and evacuated *via* syringe needles through the stopper several times with nitrogen to remove oxygen. Reagents and samples were added and removed anaerobically through the serum stopper using small syringes and needles.

RESULTS

Rapid Millipore filtration assay for ATPase

In initiating this work it was necessary to isolate and screen large numbers of presumptive ATPase defective mutants. We have devised a Millipore filtration procedure suitable for assaying large numbers of strains for ATPase activity, a procedure described in Materials and Methods. The Millipore filtration assay saves several

hours in the time needed to assay ATPase activity of whole cells[8] mainly because of the replacement of several long centrifugation steps by rapid washing of the cells on the filter. In essence treatment of small quantities of whole cells with lysozyme–EDTA for short-time periods followed by trapping of the cells on Millipore filters exposes the ATPase activity on the filter. This is illustrated in Fig. 1A. Incubation of cells with lysozyme for periods longer than 10 min did not appreciably increase ATPase activity. Mg^{2+}-ATPase activity is exposed on the filter (approx. 40% of the lysozyme–EDTA treated level) simply by collecting the cells directly on the filter without prior lysozyme treatment (Fig. 1A). Presumably the cells somehow are "shocked" on the filter, thus exposing ATPase activity; in this regard ATPase activity was not found to be exposed by centrifugation of the cells at $10000 \times g$ for 5 min followed by resuspension in a Tris–HCl buffer. ATPase activity of membrane ghosts, membrane vesicles, as well as solubilized ATPase stick tightly to the cellulose nitrate filter and may be assayed accordingly (Fig. 1B). Overloading the filter leads to the plateau observed in Fig. 1B, an effect not observed with the conventional assay of Evans[8].

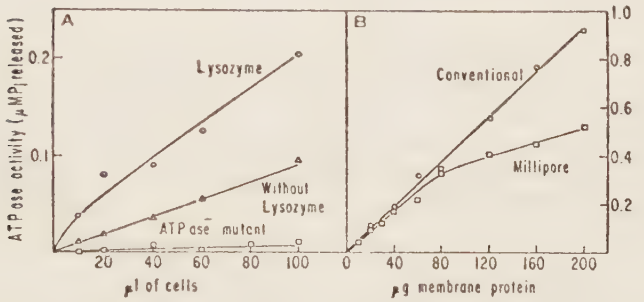


Fig. 1. (A) Millipore assay of ATPase activity of whole cells of *E. coli*. Exponentially multiplying cells at $A_{550\,nm}$ of 0.75 were used. Assay conditions for lysozyme-treated culture as described in Materials and Methods. Lysozyme and EDTA were omitted from lysing solution for cells "without lysozyme". (B) Comparison of Millipore filter assay of cell-free membrane ATPase activity *versus* "conventional" procedure. Assay conditions as described in Materials and Methods. Cell-free membrane "ghosts" with ATPase activity were prepared and stored in the frozen state using the method described by Evans[8].

We have compared the specific activities of ATPase of cells ruptured in different ways, mainly by treatment on Millipore filters, Evans' treatment[8], and sonication. Highest ATPase levels were observed after sonication. The filtration procedure gives 80% of the ATPase activity compared to sonication, an indication that not all ATPase activity is exposed on the filter. Lower values (47% compared to sonication) were obtained with the lysozyme procedure of Evans[8], perhaps due to partial solubilization of ATPase during washing of the membranes.

Unc$^-$ mutants show little if any ATPase activity, regardless of the cell breakage method we used. However, the presence of an active membrane Mg^{2+}-activated ADP hydrolyzing[8] activity capable of releasing additional P_i from ADP, the product of ATPase action, represents a potential source of error when crude preparations are being assayed. This activity is absent from purified ATPase preparations[12]. ATPase activity exposed by the filter using whole cells is a Mg^{2+}-> Mn^{2+}-> Ca^{2+}-ATPase

at pH 9. A number of enteric bacteria including *E. coli*, *Salmonella* and *Klebsiella* display ATPase activity using the Millipore method.

Mapping of coupling factor ATPase

P1 cotransduction as well as interrupted mating experiments were used by Butlin *et al.*[2] to map ATPase near *ilv* on the *E. coli* genetic linkage map. We have devised a simple technique for mapping our mutants using the F'16 (F'-*ilv*) episome which we have found carries genetic information for ATPase activity. Strains carrying the small episome, F'-*ilv* (F'16), readily donate this extrachromosomal DNA element to F$^-$, *unc*$^-$ recipients genetically converting them to the *unc*$^+$ phenotype capable of growth on succinate and other Krebs cycle intermediates as sole source of energy. Newly sired *unc*$^+$ males are sensitive to male-specific phages and are themselves donors of F'-*ilv* suggesting F' transfer of coupling factor ATPase genes. The simplest explanation of these results is that during the original excision events of the sex factor from its Hfr integration site some coupling factor ATPase genes were carried along with *ilv* genes on the episome. The cross-streak procedure described in Materials and Methods provides a simple device for mapping new *unc*$^-$ isolates; so far all six of our coupling factor mutations are covered by this episome.

Defective anaerobic growth of ATPase$^-$ *mutants*

In our initial experiments concerned with the anaerobic growth rates of the ATPase$^-$ mutants we have observed that mutants are capable of actively fermenting glucose broth in filled screw capped tubes after overnight incubation at 37 °C suggesting that ATPase activity was not essential for anaerobic growth. However, shorter term growth studies reveal, as shown in Fig. 2, that little growth occurs in anaerobic cultures of the *unc*$^-$ strain during a time period sufficient for the completion of the entire growth cycle of wild type or the mutant growing aerobically. As seen in Fig. 2, following inoculation the anaerobic *unc*$^-$ culture first develops a slight turbidity perhaps due to traces of oxygen dissolved in the medium; little further growth is observed during this experiment. Similar results have been obtained with four different mutants examined. However, after incubation for longer than 5-h revertants are

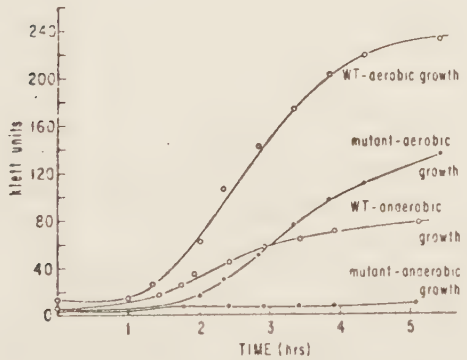


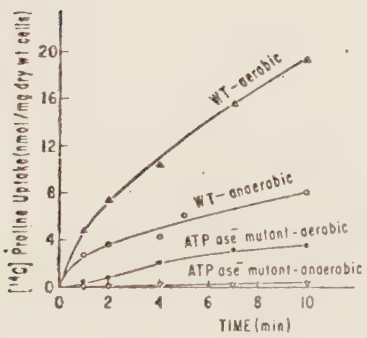
Fig. 2. Growth curves of wild type (WT) and ATPase defective strains (mutant) in glucose broth under aerobic *versus* anaerobic conditions. Anaerobic growth was carried out in completely filled screw-cap tubes adapted to fit the Klett colorimeter (540 filter). See Materials and Methods for further details.

commonly encountered. It is of some interest that addition of NO_3^- (0.2%) as terminal electron acceptor (data not shown) restores active growth to the *unc*$^-$, anaerobic culture after a short period of adaptation (approx. 60 min). Note also that the doubling time of the mutant is roughly twice that of the parent, a finding we have observed with all of our mutants.

Our major conclusion from growth studies is that *unc*$^-$ mutants defective in ATPase activity are unable to multiply anaerobically. The physiological defect(s) of the *unc*$^-$ strains was next investigated.

A lesion in active transport

Experiments in this section are concerned with anaerobic active transport or uptake of [^{14}C]proline by whole cells. This amino acid was chosen as representative of a series of 16 amino acids known to be taken up by *E. coli*[13]. As shown in Fig. 3, intact cells of *unc*$^-$ mutants defective in ATPase are completely blocked in their ability to perform active transport of radioactive proline under strictly anaerobic conditions. It should be emphasized that the defect in active transport by *unc*$^-$ strains is "conditional" with transport taking place under aerobic conditions, though at somewhat reduced levels in comparison to the wild type strain under similar conditions. In four different experiments the average values after 10 min of incubation for aerobic uptake of [^{14}C]proline for *unc*$^-$ mutant cells was 39% that of the wild type strain (100%). In these same four experiments anaerobic uptake by wild type cells was 68% that of aerobic uptake by wild type cells (100%). In comparison anaerobic uptake by *unc*$^-$ cells was only about 5% that of aerobic uptake by *unc*$^-$ cells (100%). In other words, the *unc*$^-$ strain anaerobically transports [^{14}C]proline at a rate approximately one-



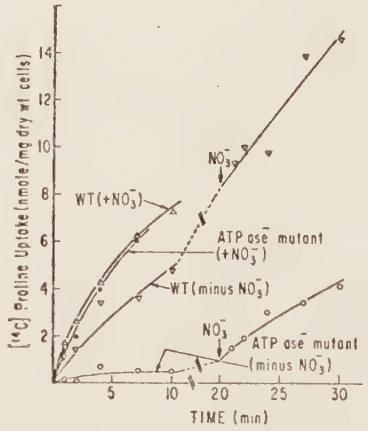


Fig. 3. Block of [^{14}C]proline uptake by whole cells of an ATPase defective mutant under strictly anaerobic conditions. The experimental conditions of Simoni and Shallenberger[4] were followed. Also see text for further details. Cellular dry weights were calculated using the expression of Simoni and Shallenberger[4].

Fig. 4. Coupling of nitrate respiration to anaerobic [^{14}C]proline uptake in an ATPase defective mutant. Conditions similar to Fig. 3, except at the times indicated by arrows 0.2% NO_3^- was added by syringe through the serum stopper.

twelfth as fast as wild type under similar conditions, a finding we have repeated with four different *unc*$^-$ strains.

The last experiment is concerned with the role of NO_3^- as terminal electron acceptor coupled to anaerobic transport. We observed that addition of NO_3^- to anaerobic glucose-broth cultures of ATPase$^-$ mutants promotes growth while control cultures without NO_3^- fail to grow. The wild type of course does not require NO_3^- for anaerobic growth on glucose. As illustrated in Fig. 4, NO_3^- is able to effectively replace O_2 as exogenous electron acceptor in NO_3^--adapted cells for anaerobic respiratory coupled transport of proline. Note that the mutant cells in the absence of acceptor (ATPase$^-$ mutant, *minus* NO_3^-) display little capacity to take up proline, a function that is restored by addition of NO_3^- (arrow). On the other hand, the wild type cells are able to transport proline anaerobically without the need of NO_3^- (wild type, *minus* NO_3^-); some stimulation is observed on addition of NO_3^- (arrow). In the two curves labelled "WT, ($+NO_3^-$)" and "ATPase mutant ($+NO_3^-$)", NO_3^- was added to the cultures at the start of the experiment.

Again this experiment shows that ATPase$^-$ mutants have a defective transport system under anaerobic conditions with anaerobic respiration of NO_3^--providing energy for anaerobic transport.

CONCLUSIONS

Our studies have been concerned with the mechanism of energy interconversion coupled to active transport in the anaerobic membrane. The elegant studies of Kaback and his associates[3,13] with membrane vesicles of *E. coli* have shed new light on the mechanism of respiratory-linked active transport of amino acids and other nutrients in *E. coli*. It should be emphasized that vesicle preparations catalyze the active concentration of amino acids and certain sugars only in the presence of a respiratory substrate such as D-lactate or succinate as electron donor and oxygen as terminal electron acceptor[13]. In other words, vesicle preparations are inactive under anaerobic conditions, in contrast to whole cells which are active under strictly anaerobic conditions (see Figs 3 and 4). Indeed *E. coli* grows at the expense of energy derived from fermentation of a variety of sugars under strictly anaerobic conditions as do many other facultative and strictly anaerobic bacteria, many of which do not synthesize cytochromes or a respiratory electron transport chain. This has led Harold[1], in a lucid survey of the recent literature in this field, to question the universality of respiratory-coupled active transport in bacteria. In simplest terms anaerobic bacteria must have an alternate mechanism(s) of energy supply for membrane work. Unfortunately little is yet known about the mechanism of energy conversion in the anaerobic membrane. Harold[1] speculates that ATP derived from substrate level phosphorylation may serve as energy source for membrane activity in anaerobic bacteria. It should be recalled that Kaback and associates[3,13] have presented clear-cut experimental evidence against phosphorylated intermediates in the respiratory-linkeed vesicle uptake system of *E. coli* (see discussion by Lombardi and Kaback[13]). However, these findings do not rule out the possibility of phosphorylated intermediates in fermentation (nonrespiratory)-coupled uptake systems. Our findings support Harold's viewpoint, mainly that the anaerobic- and respiratory-linked systems should be considered as unrelated processes.

The availability of membrane ATPase or coupling factor mutants (*unc*$^-$) of *E. coli*[2] has permitted study of the role of this enzyme in anaerobic membrane metabolism. Growth studies reveal that *unc*$^-$ mutants missing membrane ATPase activity are unable to grow anaerobically on glucose. We conclude from these experiments that anaerobic growth and anaerobic active transport somehow require membrane ATPase or coupling factor activity. This need is overcome by respiration. The simplest explanation (working hypothesis) is that *unc*$^-$ cells are totally dependent on respiration-linked energy supply for their membrane function. This is in contrast to the normal wild type *E. coli* cell which can apparently also utilize membrane coupling factor to link energy from glycolysis to membrane energy needs.

In four different experiments we found that the aerobic uptake of proline by ATPase-defective mutants was consistently lower, being 20–50% that of wild type. One possible explanation of this finding is that ATPase contributes to, but is obviously not essential for, aerobic transport.

As shown in Fig. 4, anaerobic uptake of proline by ATPase mutants is restored by addition of NO_3^- which behaves as a terminal electron acceptor replacing oxygen; also we have observed that anaerobic growth of these mutants is restored by addition of NO_3^- to the medium. It thus seems likely that anaerobic respiration of NO_3^- supplies energy for active transport.

Finally, our findings are in agreement with those recently reported by Schairer and Haddock[5] who observed that respiratory poisons such as KCN completely abolish uptake of the β-galactoside, (TMG), in ATPase defective strains. These workers concluded that ATPase is necessary for coupling of ATP hydrolysis to the accumulation of TMG in the absence of respiration. Thus ATPase or coupling factor activity appears essential for anaerobic active transport of certain sugars as well as amino acids. The question of whether ATP functions directly as energy source for anaerobic transport must await future biochemical experiments. While this paper was in preparation Butlin *et al.*[14] published their finding that *unc* A mutants are impaired in anaerobic growth. They also describe a new class of uncoupled mutants (*unc* B) and discuss the role of coupling factor proteins in oxidative phosphorylation in *E. coli*.

ACKNOWLEDGMENTS

We especially thank Francisco Luna for preparation of the ATPase mutants. Research supported by a grant from the National Science Foundation (GB-35331). M. N. is the recipient of a grant from the Centre National de la Recherche Scientifique and a travel grant under the Fulbright–Hays Program for studies in the laboratory of Prof. M. D. Kamen, whom we thank for encouragement and support.

REFERENCES

1 Harold, F. M. (1972) *Bacteriol. Rev.* 172–216
2 Butlin, J. D., Cox, G. B. and Gibson, F. (1971) *Biochem. J.* 124, 75–81
3 Hong, J.-S. and Kaback, H. R. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 69, 3336–3340
4 Simoni, R. D. and Shallenberger, M. K. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 69, 2663–2667
5 Schairer, H. U. and Haddock, B. A. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 544–551
6 Kanner, B. I. and Gutnick, D. L. (1972) *J. Bacteriol.* 111, 287–289

7 Roth, J. R. (1970) in *Methods in Enzymology* (Tabor, H. and Tabor, C. W., eds), Vol. 27, pp. 3–34, Academic Press, New York
8 Evans, Jr, D. J. (1969) *J. Bacteriol.* 100, 914–922
9 Fiske, C. H. and SubbaRow, J. (1925) *J. Biol. Chem.* 66, 375–400
10 Shapiro, B. M. and Stadtman, E. R. (1970) in *Methods in Enzymology* (Tabor, H. and Tabor, C. W., eds), Vol. 27, pp. 910–922, Academic Press, New York
11 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265–275
12 Kobayashi, H. and Anraku, Y. (1972) *J. Biochem. Tokyo* 71, 387–399
13 Lombardi, F. J. and Kaback, H. R. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 7844–7857
14 Butlin, J. D., Cox, G. B. and Gibson, F. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 292, 366–375

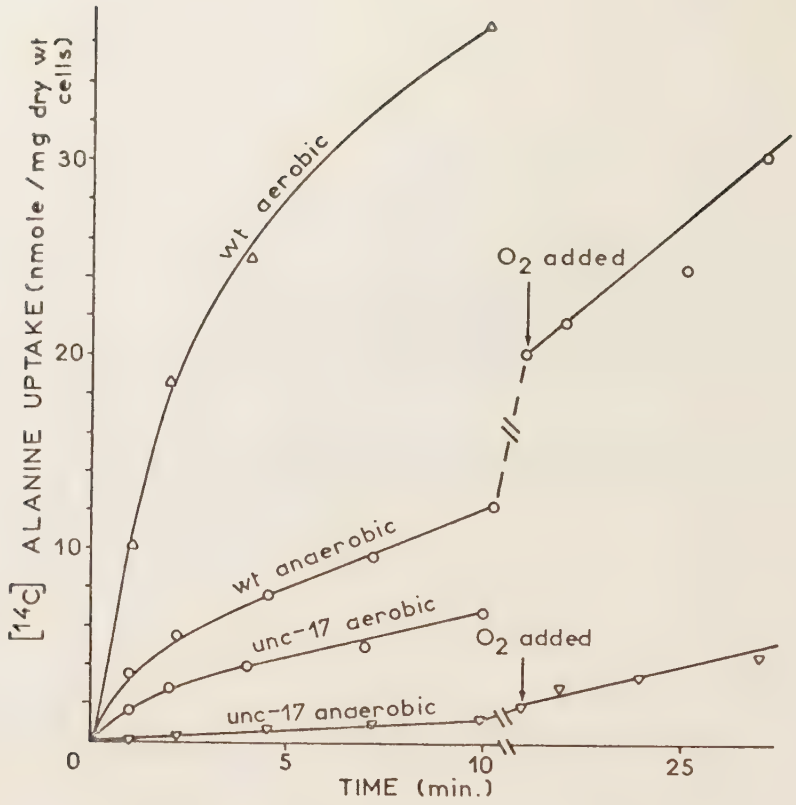


Figure 1 : Blocage du transport actif de $[^{14}C]$ alanine dans des cellules entières d'un mutant déficient en ATPase dans des conditions de stricte anaérobiose.
Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles décrites dans l'article I pour le transport de $[^{14}C]$ proline.

ADDITIF A L'ARTICLE I

Transport actif d'alanine

Afin de vérifier si le transport actif de la proline dans les cellules de mutant ne constitue pas un cas particulier nous avons effectué des expériences de transport actif d'un autre aminoacide ; l'alanine. Ces expériences ont été faites exactement dans les mêmes conditions que pour le transport actif de la proline. Nous voyons dans la figure (I) que les résultats sont identiques pour l'alanine et pour la proline. En effet, le transport d'alanine radioactive est bloqué dans le mutant lorsque celui-ci est placé dans des conditions anaérobiques. Notons que chez le mutant le transport de proline aussi bien que celui d'alanine, dans des conditions aérobiques, est fortement réduit par rapport au transport aérobique dans la souche sauvage. Nous pouvons supposer que l'ATP par l'intermédiaire de l'ATPase contribue pour une part importante dans le transport actif des aminoacides alanine et proline.

Nous noterons que l'inhibition partielle (pour le type sauvage) ou totale (pour le mutant) du transport actif d'alanine est levée lorsque des conditions aérobiques sont rétablies. Ceci nous montre que les cellules n'ont pas été irréversiblement choquées par le passage de conditions aérobiques à des conditions anaérobiques.

C H A P I T R E I I

TRANSFORMATION DE VESICULES EFFECTUANT LE TRANSPORT ACTIF D'AMINO ACIDES EN VESICULES EFFECTUANT LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE.

INTRODUCTION ET COMPLEMENT A L'ARTICLE II

Comme nous venons de le voir l'étude sur des cellules entières de E. coli de type sauvage et de mutants déficients en ATPase nous a montré que l'ATPase est nécessaire non seulement au couplage d'énergie entre la chaine respiratoire et la synthèse d'ATP mais qu'elle est aussi nécessaire pour le transport actif d'amino acides anaérobiquement et pour la croissance anaérobique. Nous avons voulu essayer de caractériser d'une manière plus biochimique le système de couplage de l'énergie entre l'ATP et le transport des amino acides par l'intermédiaire de l'ATPase. Aussi avons-nous entrepris des expériences de transport d'amino acides sur des vésicules membranaires.

Il existe plusieurs types de vésicules membranaires, obtenues suivant des modes de préparation différents. Nous avons choisi pour effectuer les expériences de transport actif d'utiliser deux sortes différentes de vésicules :

1) Nous avons choisi les vésicules préparées selon Kaback et ses collaborateurs. En effet ces vésicules sont connues pour effectuer le transport actif d'amino acides (80).

2) Nous avons travaillé sur des vésicules phosphorylantes préparées selon Butlin et coll. (55).

Il nous semble utile pour la compréhension de l'article suivant de donner une description assez précise du mode de préparation de ces deux sortes de vésicules.

I - DESCRIPTION DES VESICULES PREPAREES SELON LA METHODE DE KABACK

Les vésicules de Kaback constituent depuis déjà plusieurs années un modèle pour l'étude des problèmes de transport à travers les membranes. Elles sont obtenues par une attaque de la couche glycopeptidique rigide du mur cellulaire par le lysozyme en présence d'EDTA (67). Il en résulte une cellule osmotiquement fragile, de forme sphérique. Ces cellules osmotiquemant sensibles sont soumises à une lyse osmotique en présence d'EDTA, de DNase, et de RNase. Après une homogénéisation extensive, des lavages et des centrifugations différentielles on obtient des structures subcellulaires qui consistent pour la plus grande partie en des sacs membranaires dont le diamètre varie de 0.5 à 1.5 µm. Ces sacs apparaissent vides et sans structure interne. La pureté de ces préparations membranaires, ainsi que leur constitution ont été étudiées très en détail, en particulier dans le laboratoire de R. Kaback (67, 80).

Pour qu'un système subcellulaire puisse être utilisé comme modèle pour le transport des métabolites, il doit remplir la condition essentielle d'avoir une surface continue afin de pouvoir retenir les métabolites transportés . Certaines études montrent que les vésicules préparées selon Kaback possèdent cette propriété. La démonstration la plus convaincante de leur continuité membranaire est le fait que ces vésicules sont osmotiquement sensibles (81, 82). Elles gonflent ou rétricissent lorsque la pression osmotique environnante du milieu augmente ou diminue.

Le problème du sens selon lequel ces vésicules sont refermées par rapport à la cellule entière est également très important pour l'interprétation des propriétés de ces vésicules (en particulier pour les propriétés de transport actif et de phosphorylation oxydative, comme nous le verrons dans l'article ci-joint). Cette question est extrêmement controversée. Alors que les résultats de Kaback et coll. (68, 83) ainsi que d'autres auteurs, tels que Mitchell (63) suggèrent que la majorité de ces vésicules est refermée dans le même sens que la cellule originale, d'autres auteurs soutiennent que ces vésicules constituent une population hétérogène dont la moitié serait refermée en sens inverse de la cellule (84-86)

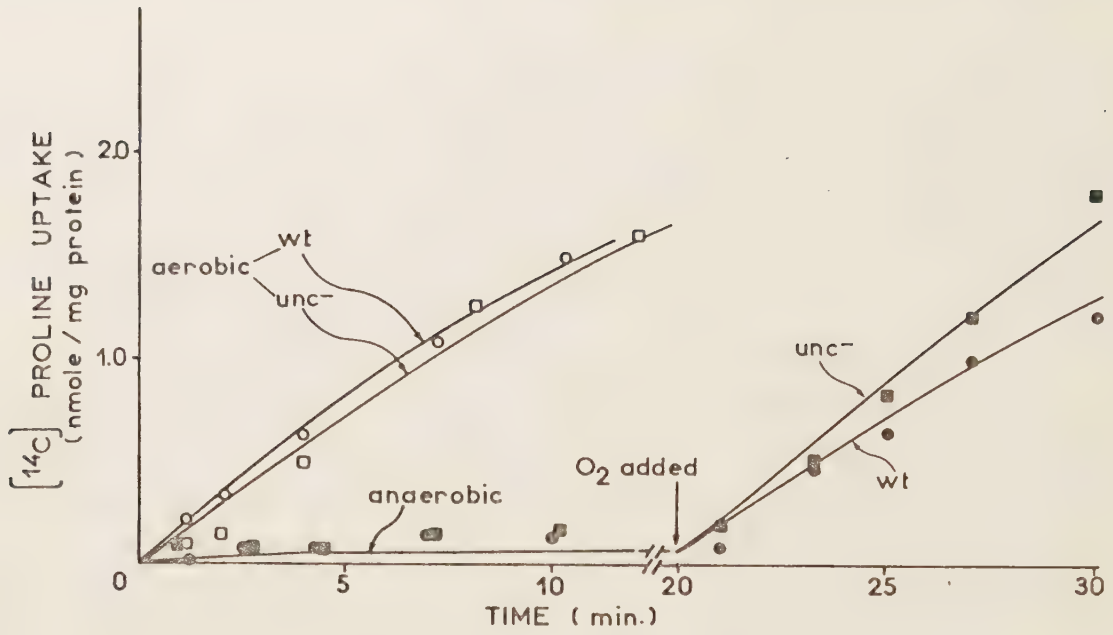


Figure I : Inhibition du transport actif de $\left[^{14}C\right]$ proline par des vésicules préparées selon la méthode de Kaback dans des conditions de stricte anaérobiose. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles décrites dans l'article II.

En tous les cas les vésicules membranaires préparées selon Kaback, tout au moins celles qui sont refermées dans le même sens que la cellule originale, effectuent le transport actif d'amino acides et de sucres en présence de D-lactate ; D-L α-hydroxybutyrate et NADH peuvent remplacer le D-lactate comme fournisseur d'énergie mais avec une efficacité beaucoup plus faible que le D-lactate (82, 87).

II - TRANSPORT ACTIF DE PROLINE DANS DES VESICULES MEMBRANAIRES PREPAREES SELON KABACK

Nous avons répété sur les vésicules préparées selon Kaback les expériences de transport de proline radioactive dans des conditions aérobiques et anaérobiques. Nous voyons sur la figure (I) que les vésicules membranaires préparées à partir de mutants ou de types sauvages transportent la proline avec la même efficacité en aérobiose. Cependant anaérobiquement, dans le mutant aussi bien que dans le type sauvage le transport de proline est complètement inhibé. Cette inhibition n'est pas due à une destruction provoquée par le fait de transférer les vésicules d'un environnement aérobique dans un environnement anaérobique, puisque comme nous le voyons sur la figure I, le transport actif de proline est restauré lorsque le flacon est ouvert à l'air. Il apparait donc que les vésicules de Kaback préparées à partir de cellules de type sauvage sont inactives anaérobiquement quant au transport de la proline, alors que les cellules entières peuvent effectuer ce transport.

Si l'on pense qu'une fonction réclamant de l'énergie comme le transport actif d'amino acides peut s'effectuer par deux voies ; d'une part par la voie de la chaine respiratoire, et cette voie n'est pas altérée dans les vésicules de Kaback de types sauvages ou de mutants, d'autre part en anaérobiose par la voie de l'hydrolyse de l'ATP, le manque de transport actif anaérobiquement dans les vésicules de types sauvages peut s'expliquer de la manière suivante : si les vésicules sont refermées du même côté que la cellule originale, l'ATP présent dans le milieu extérieur ne pourra atteindre ses sites d'action qui sont situés sur la face interne de la vésicule.

Cette hypothèse expliquerait pourquoi ces vésicules n'effectuent pas la phosphorylation oxydative, la raison étant l'inaccessibilité des substrats, AMP ou ADP aux sites de couplage d'énergie. Pour tester cette hypothèse nous avons essayé d'enfermer de l'ATP ou des précurseurs de l'ATP, AMP ou ADP à l'intérieur des vésicules. Nous ajoutions de l'ATP, AMP et ADP dans la suspension cellulaire pendant l'étape où les cellules subissent la lyse osmotique. Cependant les phénomènes semblent plus complexes car toutes nos tentatives pour obtenir un transport actif de proline anaérobiquement ont été sans résultat.

Bien sûr, on peut envisager une autre hypothèse, à savoir que le système complexe qui effectue la phosphorylation oxydative a été endommagé au cours de la préparation des vésicules. Nous verrons dans l'article ci-joint qu'il n'en est pas ainsi.

III - PREPARATION DE VESICULES SELON GIBSON

Il existe d'autres méthodes pour fabriquer des vésicules membranaires. En particulier, le procédé employé par Butlin et coll.(55) fournit des vésicules qui possèdent la phosphorylation oxydative. Cependant comme pour toutes les vésicules obtenues à partir de bactéries le rendement de la phosphorylation oxydative est faible (P/O de l'ordre de 0.1 à 0.2). Ces vésicules sont obtenues en cassant des cellules entières au moyen d'un fractionnateur Ribi Sorvall. Une première centrifugation élimine les composants lourds (débris cellulaires). Les vésicules sont recueillies dans le culot d'une deuxième centrifugation de 4 heures à 100 000g.

Dans l'article suivant nous avons comparé les propriétés de ces deux types de vésicules quant au transport actif d'amino acides et quant à la phosphorylation oxydative. Nous en avons tiré des renseignements concernant la topologie de ces deux sortes de vésicules (ou plus précisément la manière dont elles sont refermées par comparaison avec la cellule entière). Nous avons montré d'autre part que les vésicules préparées selon la méthode de Kaback possédaient à l'état latent la phosphorylation oxydative et qu'il était possible de récupérer une partie des capacités de phosphorylation oxydative par une opération consistant à retourner les vésicules de manière à ce que la face interne vienne en contact avec le milieu extérieur.

Reprinted from

Biochimica et Biophysica Acta, 357 (1974) 63–66
© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam – Printed in The Netherlands

BBA 46775

CONVERSION OF ACTIVE TRANSPORT VESICLES OF *ESCHERICHIA COLI* INTO OXIDATIVE PHOSPHORYLATION VESICLES

MARYVONNE MÉVEL-NINIO and THOMAS YAMAMOTO

Department of Chemistry, University of California, San Diego, La Jolla, Calif. 92037 (U.S.A.)

(Received January 21st, 1974)

SUMMARY

Passage of membrane vesicles of *Escherichia coli* which catalyze active transport but not oxidative phosphorylation through a French pressure cell yields vesicles which catalyze oxidative phosphorylation but not active transport. The properties of these two species of membrane vesicles are described.

INTRODUCTION

Membrane vesicles derived from *E. coli* are becoming increasingly important research tools for studies of membrane biochemistry. This communication is concerned with two species of membrane vesicles that can be prepared from this organism. One species referred to in the title as "active transport vesicles" [1] catalyzes active transport of amino acids and certain sugars in the presence of an electron donor such as D-lactate with oxygen as terminal acceptor; this transport class of vesicles shows little capacity for oxidative phosphorylation [2, 3]. We have found that "oxidative phosphorylation vesicles" prepared by the method of Butlin et al. [4] have oxidative phosphorylation capacity but little ability to transport amino acids.

RESULTS AND DISCUSSION

Two experiments, which are pertinent to the argument that two different species of vesicles can be generated from *E. coli* membranes, are described here. In the first experiment summarized in Fig. 1 the rates of active transport of [^{14}C]proline are compared between active transport vesicles, active transport vesicles ruptured in the Ribi press (20 000 lb/inch^2), and oxidative phosphorylation vesicles prepared by the procedure of Butlin et al. [4]. Note that the specific activity (nmoles proline transported/mg vesicle protein per min) of the active transport vesicles is more than ten times greater than the specific activity of the oxidative phosphorylation vesicles which possess very little transport activity.

Kaback [1] has shown that preparations of active transport vesicles, as observed in the electron microscope, consist predominantly of intact "sacs" varying from 0.5–1.5 μ in diameter. Apparently active transport vesicles are, on average, much

64

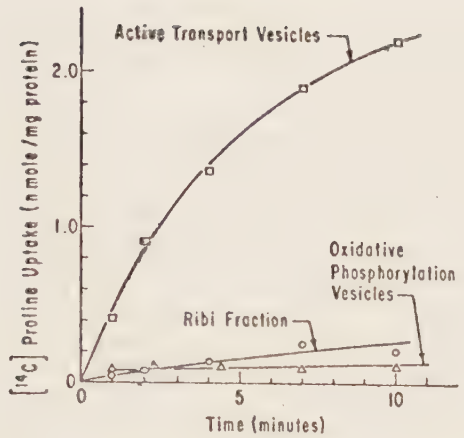


Fig. 1. Loss of active transport of [^{14}C]proline following passage of active transport vesicles through a French pressure cell (Ribi). Active transport vesicles from *E. coli* K12 (3110) were prepared as described in Table I. Vesicles were ruptured by passage through a Ribi cell fractionator. Oxidative phosphorylation vesicles were prepared according to the method of Butlin et al. [4]. Active transport of [^{14}C]proline was measured by the procedure of Kaback [1]. Each assay vessel, containing 1–4 mg protein, was preincubated at 30 °C for 10 min. To start the reaction [^{14}C]proline was added and at the times indicated aliquots of 0.3 ml were removed and collected on a Millipore filter for counting.

larger than oxidative phosphorylation particles [4] which require much greater centrifugation speeds for pelleting. It occurred to us that the rupturing of larger active transport vesicles might yield the smaller species of vesicles capable of catalyzing oxidative phosphorylation.

Table I summarizes the balance sheet of active transport and oxidative phosphorylation activities respectively, following rupturing of active transport vesicles with the Ribi fractionator. Note in Expt 1 that active transport activity of vesicles is strongly inhibited after passage through the Ribi; the ruptured vesicles retain only about 14 % of their original active transport activity. On the other hand a seven-fold net increase in oxidative phosphorylation activity was observed. Respiration capacity (lactate $\overset{e^-}{\rightarrow} O_2$) was not significantly altered during the rupturing process. The conditions for Expts 2 and 3 were similar to Expt 1 except that following the Ribi step, oxidative phosphorylation particles were collected by centrifugation [4]. These vesicles have activities comparable with those of Expt 1. In Expt 4 active transport and oxidative phosphorylation vesicles were prepared from an uncoupled (*unc A*) mutant. Note that active transport activities of both species of vesicles prepared from the uncoupled mutant are similar to the "wild-type" vesicles. As expected, oxidative phosphorylation activities are blocked in the mutant. Data on oxidative phosphorylation particles prepared by the method of Butlin et al. [4] is included for comparative purposes; note that these particles catalyze oxidative phosphorylation whereas they exhibit only about 5% of the active transport ability of activetransport vesicles (Expt 5).

It should be mentioned that a P/O ratio of 0.1–0.2 was normally obtained with freshly prepared oxidative phosphorylation particles in agreement with the finding of Butlin et al. [4]. However, the P/O ratios obtained with ruptured active transport vesicles were approximately 1/10 this value. One possible explanation of these low values is the loss or denaturation of energy transducing ATPase occurring during

TABLE I

CONVERSION OF ACTIVE TRANSPORT VESICLES TO OXIDATIVE PHOSPHORYLATION VESICLES

Active transport vesicles, prepared by the procedure of Kaback [1] (with the exception that EDTA was omitted after the lysis step), were ruptured by passage through a Ribi cell fractionator. This fraction labelled "after Ribi fractionation" was used directly for Expt 1 whereas for Expts 2 and 3 oxidative phosphorylation particles were collected from the Ribi fraction by centrifugation according to the procedure of Butlin et al. [4]. Oxidative phosphorylation vesicles for Expts 4 and 5 were prepared according to the method described by these authors [4]. The assay mixture for oxidative phosphorylation contained 0.2–0.6 mg vesicle protein, 5 mM sodium–potassium phosphate buffer at pH 7.0, 5 mM $MgCl_2$, 15 mM AMP, 3.1 μM ADP, and 18.8 mM D-lactate to a final volume of 3.2 ml. After 15 min incubation at 30 °C the reaction was terminated by addition of 0.25 ml of 1.8 M H_2SO_4, denatured protein removed by centrifugation and the sample neutralized with KOH. ATP concentrations were measured using the luciferase assay [9]. Oxygen uptake was measured using an oxygen electrode [10]. Proline uptake was measured as described for Fig. 1. The *unc A* mutant used is a derivative of *E. coli* K12 (3110; our laboratory strain *unc* 17) whose properties are described in an earlier paper [11].

Expt Number	Method of vesicle preparation	O_2 uptake (natoms/min per mg protein)	ATP synthesized (nmole/min per mg protein)	P/O × 10^3	Proline uptake (nmole/10 min per mg protein)
1	Active transport vesicles	155	0.05	0.7	2.2
	After Ribi fractionation	144	0.35	6	0.3
2	Active transport vesicles	90	0.02	0.35	—
	After Ribi fractionation	233	0.47	4	—
3	Active transport vesicles	110	0.02	0.41	2.6
	After Ribi fractionation	142	0.31	4.3	—
4	Active transport vesicles (*unc A* mutant)	—	—	—	2.0
	Oxidative phosphorylation vesicles (*unc A* mutant)	70	<0.02	<0.5	0.3
5	Oxidative phosphorylation vesicles	110	5.6	102	0.12

handling of the vesicles. The extreme sensitivity of the luciferase assay [9] used plus the availability of extracts of *unc A* mutants prepared by identical procedures which show no oxidative phosphorylation (negative controls) give us confidence that the phosphorylation rates observed, though small, are nonetheless reliable.

Kaback and Barnes Sr [2], as well as other investigators [3] have reported that membrane vesicles of *E. coli* which retain their ability to transport amino acids and other nutrients show little capacity for oxidative phosphorylation. This is so even though these vesicle preparations possess an active respiratory system with oxygen as terminal electron acceptor. On the other hand, Butlin et al. [4] have described the production of oxidative phosphorylation vesicles which as reported here retain little active transport activity. It is postulated that the larger vesicles retain the right side in membrane morphology, allowing for concentration of amino acids but preventing oxidative phosphorylation since substrates such as ADP cannot reach the phosphorylation sites on the inside surface of the membrane. However, the smaller vesicles are

thought to be inside-out, exposing the oxidative phosphorylation sites and allowing substrate accessibility, but maintaining the wrong-sidedness for the concentration of amino acids. It is interesting to speculate that rupturing of the large vesicles reverses their topology and exposes their latent potential for oxidative phosphorylation.

Van Thienen and Postma [5] have recently observed that disruption of washed active transport vesicles by Triton X-100 increased the level of assayable ATPase by more than 5-fold. These workers conclude that ATPase present on the inner membrane surface of active transport vesicles is exposed to its substrate ATP after disruption with detergent. We have confirmed this finding, rupturing the active transport vesicles in a French pressure cell (instead of treatment with Triton), and have found in two separate experiments an increase in specific activity (μmole P_i released/min per mg protein) from 0.625–2.5 and from 0.64–1.5 before and after rupturing. These values are higher than those reported by Van Thienen and Postma [5] because we performed our assays at the optimum pH of the enzyme (pH 9). Using another approach, Hanson and Kennedy [6] have observed that the activity of vesicles which catalyze ATP-dependent reverse electron flow are completely blocked by antibody against coupling factor (ATPase). Though not measured in these experiments, it is probable that oxidative phosphorylation activity would be similarly inhibited. In order for antibody to block activity it seems probable that coupling factor must be located on the outer surface of these vesicles. These experiments support the view that two biochemical species of vesicles may be prepared from *E. coli* membranes, mainly active transport vesicles and oxidative phosphorylation vesicles. The reader is referred to articles by Harold [7] and Asano et al. [8] for further discussion of mitochondrial and bacterial membranes, respectively.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by National Science Foundation grants awarded to Raymond C. Valentine (GB-35331) and Martin D. Kamen (GB-36019X). M.M.-N. is a predoctoral fellow supported by a grant from the Centre National de la Recherche Scientifique. Part of this work was carried out in the laboratory of Professor M. D. Kamen whom we thank for encouragement and advice.

REFERENCES

1 Kaback, H. R. (1971) in Methods in Enzymology (Jacoby, W. B., ed.), Vol. 22, pp. 99–120, Academic Press, New York
2 Kaback, H. R. and Barnes, Jr, E. M. (1971) J. Biol. Chem. 246, 5523–5531
3 Klein, W. L. and Boyer, P. D. (1972) J. Biol. Chem. 247, 7257–7265
4 Butlin, J. D., Cox, G. B. and Gibson, F. (1973) Biochim. Biophys. Acta 292, 366–375
5 Van Thienen, G. and Postma, P. W. (1973) Biochim. Biophys. Acta 232, 429–440
6 Hanson, R. L. and Kennedy, E. P. (1973) J. Bacteriol. 114, 772–781
7 Harold, F. M. (1972) Bacteriol. Rev. 36, 172–216
8 Asano, A., Cohen, N. S., Baker, R. F., and Brodie, A. F. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3386–3397
9 Strehler, B. L. (1963) in Methods in Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. V., ed.), p. 559, Academic Press, New York
10 Kielley, W. W. (1963) in Methods in Enzymology (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., eds), Vol. 6, pp. 272–277, Academic Press, New York
11 Yamamoto, T. H., Ninio, M. M., and Valentine, R. C. (1973) Biochim. Biophys. Acta 314, 267–275

C H A P I T R E I I I

ROLE DE L'ATPase DANS LA SYNTHESE DU DNA CHEZ E. COLI

L'ATPase semble jouer un rôle crucial pour fournir l'énergie dans diverses fonctions anaérobiques membranaires chez E. coli. En effet des mutants possédant une activité ATPase très réduite sont incapables d'effectuer un certain nombre de fonctions membranaires parmi lesquelles; la phosphorylation oxydative (52, 77), la réaction de transhydrogénation dépendante en ATP (52, 54), le transport anaérobique d'amino acides et de sucres (88, 89, 54, 76), la croissance anaérobique (55, 88) et la motilité anaérobique (90, 91).

Nous avons envisagé que l'ATPase pourrait intervenir dans des processus membranaires plus complexes comme copulation bactérienne, infection virale, replication du DNA de E.coli.Personnellement je me suis attachée à étudier le rôle de l'ATPase dans la réplication du DNA de E. coli.

Depuis déjà plusieurs années certains groupes de chercheurs considèrent que la réplication du DNA chez les bactéries pourrait être un phénomène associé à la membrane. L'idée en a été tout d'abord émise par Jacob, Brenner et Cuzin en 1963 (69). K. Fields et S. Luria ont étudié la relation entre la synthèse du DNA et l'endommagement de la membrane de E. coli par la colicine K (70, 71) Cependant cette étude est rendue compliquée par le fait que la colicine K interfère avec de nombreuses fonctions membranaires réclamant de l'énergie. Elle a de multiples effets sur les cellules; la synthèse du DNA, de RNA et des protéines cesse brutalement ; les niveaux d'ATP sont diminués d'un tiers quoique la respiration continue, le transport actif de thiomethylgalactoside est bloqué. Aussi l'inhibition de la synthèse du DNA par la colicine pourrait n'être liée qu'indirectement à l'action de la colicine sur la membrane.

Il y a quelques années également Jarett et Hendler (92) ont cherché à savoir s'il y avait une relation entre la synthèse d'acide ribonucléique et la phosphorylation oxydative. Ils ont trouvé que deux agents découplants classiques de l'oxydation phosphorylative, le 2,4 dinitrophénol et l'azide inhibent fortement la synthèse d'acide ribonucléique (RNA) chez Saccharomyces cerevisiae quand celui-ci était cultivé dans des conditions anaérobiques.

L'existence de mutants unc$^-$, découplés quant à la phosphorylation oxydative nous a permis d'éviter l'utilisation d'agents

découplants. En effet l'interprétation des résultats, lorsqu'on utilise des agents découplants, peut être rendue difficile si on ne connait pas exactement le mode d'action de ces agents.

Dans l'article suivant nous avons montré que la synthèse du DNA est fortement inhibée anaérobiquement dans les mutants unc- déficients en ATPase. La synthèse est restaurée anaérobiquement, lorsque l'on ajoute au milieu un récepteur d'électrons comme le nitrate. Il semble donc que les mutants dépourvus d'ATPase soient dépendants de l'énergie fournie par la chaine respiratoire pour la synthèse de leur DNA. Il en découle que l'ATPase doit jouer un rôle au moins anaérobiquement dans la synthèse du DNA.

Reprinted from

Biochimica et Biophysica Acta, 376 (1975) 485–491
© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam – Printed in The Netherlands

BBA 46873

ENERGY REQUIREMENT FOR BIOSYNTHESIS OF DNA IN *ESCHERICHIA COLI*

ROLE OF MEMBRANE-BOUND ENERGY-TRANSDUCING ATPase (COUPLING FACTOR)

MARYVONNE T. MÉVEL-NINIO* and RAYMOND C. VALENTINE

Department of Chemistry, University of California, San Diego, La Jolla, Calif. 92037 (U.S.A.)

(Received September 9th, 1974)

SUMMARY

A mutant of *Escherichia coli* missing energy-transducing ATPase and known to be defective in a variety of membrane functions from earlier studies (Yamamoto, T. H., Mével-Ninio, M. and Valentine, R. C. (1973) Biochim. Biophys. Acta 314, 267–275; Thipayathasana, P. and Valentine, R. C. (1974) Biochim. Biophys. Acta 347, 464–468; Mével-Ninio, M. and Yamamoto, T. (1974) Biochim. Biophys. Acta 357, 63–66) has been found to be blocked for anaerobic DNA synthesis. The rate of anaerobic DNA synthesis in the mutant, measured as radioactive adenine incorporation into the alkali-resistant fraction of whole cells, is about 1/6 the rate of DNA synthesis in the wild type culture under similar conditions. Addition of NO_3^- or O_2 restores DNA biosynthesis in the mutant. The entry of radioactive adenine is not appreciably affected in the mutant by anaerobiosis. It is concluded that coupling factor plays a role in some step(s) of DNA biosynthesis.

INTRODUCTION

Membrane-associated energy-transducing ATPase (also (Mg^{2+}, Ca^{2+})-ATPase or coupling factor) of *Escherichia coli* has recently been implicated through the study of mutants missing ATPase (*unc* A) as essential for a variety of membrane functions including oxidative phosphorylation [1, 2], ATP-dependent transhydrogenation of pyridine nucleotides [3], anaerobic active transport of amino acids [4, 5] and sugar [6], anaerobic motility [7] and anaerobic growth [4, 8]. A number of the anaerobic functions missing in the *unc* A mutants have been found to be restored by NO_3^- [4, 7] which serves as terminal electron acceptor during anaerobic respiration. These studies have led us to consider the possible role of this crucial membrane enzyme in DNA biosynthesis, a process that many workers consider to be somehow associated with the cell membrane (see ref. 9 for a general review). Experiments on DNA synthesis in a mutant missing ATPase activity are reported in this communication.

* Present address: Centre de Génétique Moléculaire du C.N.R.S., 91 Gif-sur-Yvette, France.

MATERIALS AND METHODS

Organism and growth conditions

The mutant (our laboratory strain *unc*-17) used in this work was derived from *E. coli* K12 (W3110) as described previously [4]. Stock cultures of the wild type and the mutant were maintained aerobically on agar plates of Davis minimum salts medium [10] supplemented with 0.4 % glucose. The cells were grown in M-9 medium [11] supplemented with 1 mM $MgSO_4$, 0.1 mM $CaCl_2$, 0.17 μM ferrous citrate and 0.45 % glucose.

To start an experiment a liquid cell culture, previously grown to early exponential phase of growth (about 20 Klett units) and stored at 4 °C, was diluted with an equal volume of fresh medium and grown to a cell density of 70 Klett units.

NO_3^--grown cells were cultured anaerobically (filled stationary tubes) in similar medium supplemented with 0.2 % $NaNO_3$. When necessary, cells were freed of NO_3^- by two cycles of centrifugation (about 10 000 × *g* for 10 min at room temperature) with washing medium lacking NO_3^-. After each experiment the culture was checked for revertants capable of growing on succinate as a carbon source (presumably wild type) by streaking a loopful of cells onto Davis minimum salts medium agar plates supplemented with 0.4 % succinate.

P1 transduction

For mapping the *unc-17* lesion a lysate of the generalized transducing phage P1 was grown on the *unc* mutant as donor with an *ilv*$^-$ auxotroph serving as recipient. Handling of phage and the procedure for performing P1 crosses were as described by Miller [11]. Recombinants for *ilv*$^+$ were scored for the *unc* phenotype by spot testing on medium containing succinate.

Assay for DNA synthesis

The DNA was labeled with tritiated adenine; adenine was chosen as label because of extensive previous studies of adenine transport in *E. coli* [12]. For aerobic experiments 1 μCi of [2-^{3}H]adenine (67 μCi/mol, New England Nuclear) diluted in 25 μg of cold adenine was added to 5 ml of exponentially growing cells in a 125-ml erlenmeyer flask incubated at 30 °C. Aliquots of 0.5 ml of the radioactive cells were removed and added to tubes containing 0.5 ml of 0.5 M NaOH and the samples were digested for 16 h at room temperature to hydrolyze the labelled RNA fraction. To collect the radioactive DNA the samples were first neutralized with 50 % trichloroacetic acid at 0 °C, filtered on Millipore cellulose nitrate pads (0.45 μm) and washed three times on the filter with 5 ml of 5 % trichloroacetic acid. For counting, the filters were dried and counted in toluene liquid scintillation fluid.

For anaerobic DNA labelling experiments, 5 ml of exponentially growing cells were placed in a 25-ml flask fitted with a rubber serum stopper. The flask was made anaerobic by evacuating and flushing several times with argon via a syringe needle through the stopper. A positive pressure of argon was maintained in the vessel to compensate for the volume of the samples removed, a procedure which avoids air contamination during sampling. To start the experiment, radioactive adenine (as above) was added via a small syringe through the stopper; aliquots were removed by syringe and processed as above.

Uptake of adenine

Radioactive adenine was used to measure active transport of this purine into the cells. The experimental procedure was identical to the one described above for DNA synthesis, except that radioactive samples were collected on Millipore pads directly without alkali digestion or trichloroacetic acid precipitation; cells containing radioactive adenine were washed on the filter 3 times with 5 ml of 0.5 M LiCl.

RESULTS

Mapping of unc-17

Previous workers [13] have shown by P1 transductional analysis that *unc* lesions map in a cluster on the *E. coli* chromosome near the isoleucine-valine (*ilv*) biosynthetic operon. It was therefore important to map *unc-17*, the mutant used for the following experiments on DNA biosynthesis. Transduction analysis reveals that *unc-17* is closely linked to *ilv* with 120 of 200 ilv^+ recombinants simultaneously receiving the *unc-17* phenotype in P1-mediated crosses with *unc-17* as donor and a ilv^-, unc^+ strain as recipient, a cotransduction frequency of 60 %.

Anaerobic block of DNA synthesis in an ATPase mutant

The first experiments are concerned with the relative rates of DNA biosynthesis in a coupling factor mutant and the wild type strain (Fig. 1). In Fig. 1 DNA synthesis is shown under aerobic and anaerobic conditions for both strains. Note that the rate of DNA synthesis in the mutant is strongly inhibited by anaerobiosis, being about 1/6 the rate of the wild type under similar conditions. The arrow of Fig. 1b refers to the time of exposure of the anaerobic flask to O_2, restoring aerobic conditions for DNA biosynthesis in the mutant. After exposure to O_2 the rate of DNA biosynthesis is restored to the aerobic rate, showing that the cells have not been irreversibly damaged by the anaerobiosis. As shown in Fig. 1b, the rate of aerobic DNA synthesis is

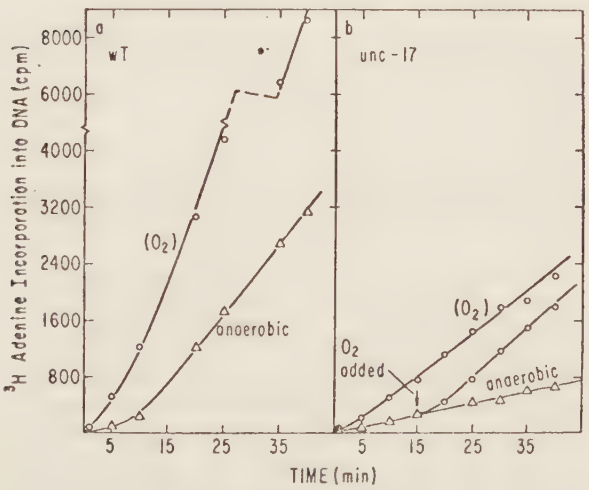


Fig. 1. Block of anaerobic DNA biosynthesis in a mutant defective for ATPase. ○, aerobic conditions; △, anaerobic conditions. Experimental details are given in Materials and Methods. Cell quantities were the same for wild type (wT) and mutant.

also considerably reduced in the mutant. ATPase may contribute significantly to DNA synthesis aerobically. Similar results have been reported for active transport of proline in this mutant [4].

NO_3^- restoration of anaerobic DNA synthesis

Experiments in this section are concerned with the restoration of anaerobic DNA synthesis by NO_3^- which functions as a terminal electron acceptor during anaerobic respiration. All the experiments are done anaerobically using cells adapted for anaerobic growth on nitrate. As in the preceding experiments (Fig. 1) the DNA synthesis in the mutant is strongly inhibited under anaerobic conditions (Fig. 2) without NO_3^-. In this experiment, the rate of anaerobic DNA synthesis of the mutant is about 1/12 the rate of wild type under similar conditions (extrapolated from the linear portion of the curves of Fig. 2); but addition of NO_3^- to the anaerobic mutant cells stimulates the anaerobic DNA synthesis by a factor of 6.5 (Fig. 2). Note that, in the mutant as well as in the wild type, the anerobic rates of DNA synthesis in the presence of NO_3^- as electron acceptor are close to the rates observed with O_2 as terminal acceptor (Fig. 1a, Fig. 2b).

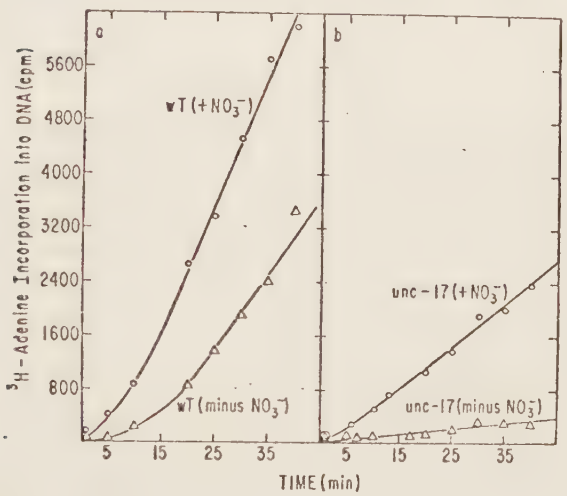


Fig. 2. Restoration of anaerobic DNA synthesis by NO_3^-. Mutant and wild type (wT) cells were grown anaerobically on NO_3^- medium and freed of exogenous NO_3^- as described in Materials and Methods. The quantity of cells used was the same in both experiments.

Adenine uptake

Hochstadt-Ozer and Stadtman [12] showed earlier that adenine transport in *E. coli* involved the conversion of adenine to AMP, a reaction catalyzed by adenine phosphoribosyltransferase and requiring *P*-Rib-*PP* as energy source. From this work, it seems improbable that the membrane-bound (Mg^{2+}, Ca^{2+})ATPase is involved in adenine transport. In conformation of this idea we have found that anaerobic transport is not appreciably affected in the mutant. As seen from Fig. 3, the level of anaerobic adenine uptake in the mutant was 85 % that of the wild type, in contrast to anaerobic DNA synthesis which is depressed by more than 90 % (Fig. 2b). Thus it seems unlikely that adenine transport is responsible for the block in anaerobic DNA synthesis.

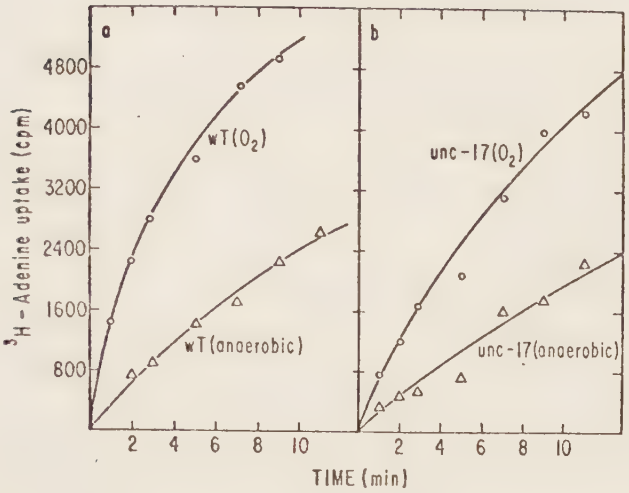


Fig. 3. Aerobic (○) and anaerobic (△) adenine uptake. Assay conditions are described in Materials and Methods. wT, wild type.

DISCUSSION

There are two recent reviews dealing mainly with membrane defects in ATPase mutants of *E. coli* [13, 14], so this disscussion will be limited to the role of ATPase in the anaerobic cell where it fulfills several vital functions. A literature survey of various anaerobic defects of the mutant strains is summarized in Table I. As seen from Table I, mutants missing this enzyme cannot grow anaerobically; anaerobic growth is restored by supplementing the culture with respiratory acceptors such as NO_3^- or O_2 [4]. We found previously that anaerobic active transport of proline is blocked in mutant *unc-17* [4], with addition of NO_3^- restoring this activity. Similarly it was recently observed that the flagella of an ATPase minus mutant were inactive during anaerobiosis [7], again being activated by NO_3^- or O_2. Thus, such seemingly diverse reactions as anaerobic active transport, anaerobic motility and anaerobic DNA biosynthesis, share an essential requirement for ATPase with NO_3^- restoring all of these functions. Note also that the system catalyzing ATP-dependent transhydrogenation of pyridine nucleotides shares similar properties [3, 15] although restoration by NO_3^- has not yet been reported for this reaction.

There are several possible mechanisms which might account for the anaerobic block of DNA synthesis in these mutants. For example, we have considered and ruled out the possibility that a block of anaerobic adenine uptake is responsible by showing that ATPase mutants transport adenine with only slightly depressed efficiency anaerobically. Also the rapid restoration of DNA synthesis upon addition of NO_3^- or O_2 to an anaerobic culture tends to rule out an "anaerobic shock" which might occur as the result of transferring the mutant grown aerobically to an anaerobic environment.

A deficiency in ATP supply in the mutant which could impair DNA synthesis has not been considered here since Larsen et al. [16] have shown that in similar ATPase mutants ATP levels are not appreciably affected by anaerobiosis.

It is possible that ATPase, or more specifically an energy-rich product of this

TABLE I

SUMMARY OF ANAEROBIC MEMBRANE DEFECTS OF *E. COLI* MUTANTS MISSING ATPase

N.D., not done. WT, wild type.

Property or reaction	Strain	Specific activity		
		Aerobic	Anaerobic	NO_3^-
Growth* (doubling time, min)	WT	25	40	N.D.
	ATPase-deficient mutant	33	>400	60
Active transport of proline [4] (nmol/10 min per mg dry wt cells)	WT	19.4	7.8	7.6
	ATPase-deficient mutant	4	0.5	7.5
Motility [7] (cpm/10 min per mg dry wt cells)	WT	8550	2300	5700
	ATPase-deficient mutant	8550	114	3800
DNA synthesis (Figs 1, 2) (cpm/30 min per mg dry wt cells)	WT	$56.8 \cdot 10^3$	$20 \cdot 10^3$	$45 \cdot 10^3$
	ATPase-deficient mutant	$17.4 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^3$	$18 \cdot 10^3$
ATP-dependent trans-hydrogenation of pyridine nucleotides (nmol NADPH formed/min per mg protein)	WT	93 [15]	77 [3]	N.D.
	ATPase-deficient mutant	116 [15]	4.2 [3]	N.D.

* Growth medium consisted of L-broth [17] supplemented with 0.5 % glucose as described in ref. 4.

enzyme derived from ATP, might be directly associated with the DNA replicative machinery. On the other hand, ATPase could be indirectly involved in DNA synthesis, being necessary for the biosynthesis, transport or maintenance of some nucleic acid precursors or some vital ions. Obviously further biochemical experiments are needed to distinguish between these mechanisms. The major conclusion of this work is that energy-transducing ATPase or coupling factor is required for anaerobic synthesis of DNA.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a National Science Foundation grant (GB-35331) to R.C.V. and in part by a National Science Foundation grant (GM-15880) to E. P. Geiduschek. M.N. is the recipient of a grant from the Centre National de la Recherche

Scientifique and a travel grant under the Fulbright-Hays Program. R.C.V. is the recipient of a Career Development Award from the U.S. Public Health Service (AI 16595). We are indebted to Dr M. D. Kamen for continued encouragement and to Dr D. Smith for helpful discussions.

REFERENCES

1 Butlin, J. D., Cox, G. B. and Gibson, F. (1971) Biochem. J. 124, 74–81
2 Mével-Ninio, M. and Yamamoto, T. (1974) Biochim. Biophys. Acta 357, 63–66
3 Cox, G. B., Newton, N. A., Butlin, J. D. and Gibson, F. (1971) Biochem. J. 125, 489–493
4 Yamamoto, T. H., Mével-Ninio, M. and Valentine, R. C. (1973) Biochim. Biophys. Acta 314, 267–275
5 Kanner, B. I. and Gutnick, D. L. (1973) FEBS Lett. 35, 217–219
6 Schairer, H. U. and Haddock, B. A. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 544–551
7 Thipayathasana, P. and Valentine, R. C. (1974) Biochim. Biophys. Acta 347, 464–468
8 Butlin, J. D., Cox, G. B. and Gibson, F. (1973) Biochim. Biophys. Acta 292, 366–375
9 Siegel, P. J. and Schaechter, M. (1973) Ann. Rev. Microbiol. 37, 261–282
10 Davis, B. D. and Mingioli, F. S. (1950) J. Bacteriol. 60, 17–28
11 Miller, J. H. (1972) in Experiments in Molecular Genetics (Cold Spring Harbor Laboratory, ed.), p. 431
12 Hochstadt-Ozer, J. and Stadtman, E. R. (1971) J. Biol. Chem. 246, 5294–5303
13 Cox, G. B. and Gibson, F. (1974) Biochim. Biophys. Acta 346, 1–25
14 Gibson, F. and Cox, B. G. (1973) Essays Biochem. 9, 1–29
15 Cox, B. G., Newton, N. A., Butlin, J. D. and Gibson, F. (1971) Biochem. J. 125, 489–493
16 Larsen, S. H., Adler, J., Gargus, J. J. and Hogg, R. W. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 71, 1239–1243
17 Luria, S. E., Adams, J. N. and Ting, R. C. (1970) Virology 12, 248–257

C O N C L U S I O N G E N E R A L E

Comme nous venons de le voir au cours de l'exposé précédent les expériences effectuées tendent à montrer que les membranes de E. coli comme les membranes mitochondriales peuvent être énergisées par la voie de la chaine respiratoire et par la voie de l'hydrolyse de l'ATP.

L'emploi d'un mutant ne possédant pas d'activité ATPase et dans lequel, pour cette raison, l'énergie libérée par la chaine respiratoire ne peut plus être couplée avec la synthèse d'ATP s'est avéré d'un intérêt considérable. Ce mutant nous a permis en effet d'étudier séparément ces deux voies génératrices d'énergie.

L'obtention de tels mutants permet d'autre part une étude biochimico-génétique des processus cellulaires énergétiques effectués par les membranes bactériennes. Cette étude commencée seulement récemment par Butlin et coll(52) semble particulièrement intéressante. Jusqu'alors l'effort pour comprendre les problèmes du transport d'électrons, de la phosphorylation oxydative et des réactions membranaires nécessitant de l'énergie avait porté particulièrement sur les mitochondries des organismes eukaryotes (93-94).

L'étude génétique de mutants mitochondriaux est extrêmement différente de l'étude des mutants de microorganismes prokaryotes. La présence de DNA dans la mitochondrie aussi bien que dans le noyau et les interactions entre ces deux systèmes de codage rend les interprétations complexes. Alors que de nombreux mutants bactériens déficients en ATPase ont été isolés (52, 56, 72, 75-77, 88) un seul mutant dépourvu d'ATPase mitochondriale a été isolé récemment par Schatz et coll(98). Il s'agit d'un mutant nucléaire affecté par ailleurs dans d'autres fonctions. Ce mutant possède des quantités très réduites des cytochromes aa_3, b et c_1 et plusieurs produits du système mitochondrial de synthèse protéique sont soit anormaux soit absents. Actuellement les propriétés de ce mutant ne sont pas bien expliquées.

Il est frappant de constater combien les ATPases mitochondriales et bactériennes sont semblables (25, 95-97) aussi bien sur le plan de l'architecture de la molécule (poids moléculaire, nombre de sous-unités, localisation sur la face interne de la membrane sous la forme de particules tigées) que sur le plan fonctionnel (2, 26). Il est donc logique de penser que les fonctions membranaires nécessitant l'énergie de l'ATP sont catalysées, dans les

bactéries et dans les mitochondries, par un complexe ATPase dont les mécanismes catalytiques sont les mêmes. Aussi, si l'on pense que les résultats expérimentaux obtenus avec l'ATPase bactérienne peuvent s'appliquer à l'ATPase mitochondriale, on voit combien l'étude de mutants bactériens dans lequels l'ATPase est altérée, peut être féconde.

Parmi tous les processus membranaires qui à priori peuvent être affectés dans les mutants de E. coli ATPase$^-$ nous avons étudié particulièrement 1) le transport actif et 2) la synthèse du DNA.

Problème du transport actif

Si dans quelques espèces bactériennes, comme par exemple Staphylococci, la phosphorylation vectorielle permet le transport de nombreux sucres (99), dans E. coli peu de sucres sont transportés par ce mécanisme. Par contre, dans E. coli, il semble que les systèmes de transport de nombreux sucres, et de presque tous les amino-acides soient couplés avec l'énergie de la chaine respiratoire (68).

Il y a quelques années de grands progrès ont été faits dans l'étude des fonctions membranaires chez les bactéries lorsque Kaback et Stadtman (80) décrivirent des systèmes membranaires subcellulaires qui effectuaient le transport de proline. Dans ces systèmes le transport d'amino-acides et de sucres est couplé préférentiellement avec une activité D-lacticodéshydrogénasique membranaire.

Kaback et Barnes (100) ont proposé un modèle dans lequel le transport d'amino-acides ou de sucres serait relié directement avec une chaine respiratoire spécialisée connectant le D-lactate au cytochrome b. Le transporteur ferait partie de cette chaine respiratoire et existerait sous deux formes ; une forme oxydée et une forme réduite ayant une orientation par rapport à la membrane et une affinité pour le substrat différente. Il semble établi que le mécanisme de transport dans ces vésicules ne fait pas intervenir l'ATP. Kaback et Konings (101) ont montré récemment que même dans des conditions anaérobiques le transport actif de lactose chez E. coli est couplé principalement avec l'énergie libérée par une chaine de transporteurs d'électrons, le fumarate ou le nitrate étant l'accepteur terminal.

Le modèle de Kaback et Barnes a été fortement contesté par certains auteurs (26) qui pensent que le transport est lié à la respiration par la voie d'un intermédiaire riche en énergie (crée par exemple par un gradient de protons) ou d'un état énergisé de la membrane, tout comme c'est le cas pour les mitochondries.

Le fait que de nombreuses bactéries, dont E.coli peuvent pousser anaérobiquement aux dépens de la glycolyse, les études présentées dans cet exposé et celles d'autres auteurs (76, 102, 103) indiquent qu'il existe d'autres systèmes de transport.

En particulier Sing et Bragg (102) décrivent des expériences effectuées avec des mutants de E. coli déficients en cytochromes. Dans ces mutants où le transport des électrons est bloqué l'ATP généré par la glycolyse permet directement le transport de phénylalanine.

Signalons également un travail récent de Rosen et Mc Clees (103) Ces auteurs ont pu obtenir un transport actif de calcium, stimulé par l'ATP, dans des vésicules membranaires de E. coli, très vraisemblablement inversées.

Si les vésicules de Kaback ne semblent pas mettre en jeu l'ATP on peut se demander si ceci n'est pas dû à des raisons topologiques. Si ces vésicules sont refermées comme la cellule originale, elles ne pourront hydrolyser l'ATP puisque les enzymes nécessaires pour cela sont localisées à l'intérieur de la membrane.

Nous même, en collaboration avec T. Yamamoto avons mené notre travail en nous basant sur cette dernière hypothèse. Nous avons essayé d'obtenir un transport actif couplé avec l'hydrolyse d'ATP dans des conditions anaérobiques. Aussi avons-nous préparé des vésicules de Kaback en essayant d'enfermer à l'intérieur de celles-ci de l'ATP ou des précurseurs d'ATP. Cependant nos tentatives ont été négatives. Il est possible que l'ATP enfermé ou produit à l'intérieur des vésicules soit hydrolysé immédiatement par l'ATPase.

Nous avons montré cependant que les vésicules de Kaback possédaient à l'état latent la capacité d'effectuer la phosphorylation oxydative et que cette propriété pouvait être démasquée.

Dans les cellules entières par contre, grâce à l'utilisation de mutants ATPase$^-$ nous avons montré que l'énergie nécessaire pour le transport actif anaérobique d'amino-acides faisait intervenir l'ATPase et par là même l'ATP.

Les deux voies, chaine respiratoire et hydrolyse d'ATP peuvent-elles fonctionner en même temps pour fournir de l'énergie ? Nos expériences tendent à montrer qu'il pourrait en être ainsi. En effet, dans le mutant ATPase⁻ le transport aérobique de proline ou d'alanine, ainsi que la synthèse de DNA sont extrêmement réduits par rapport au type sauvage. Ceci montrerait que dans le type sauvage l'ATP contribue pour une part importante dans l'énergisation de la membrane en vue d'effectuer ces fonctions.

Cette hypothèse est d'autre part renforcée par les expériences de transport actif effectuées sur les vésicules membranaires de Kaback. En effet les vésicules de Kaback étant incapables d'utiliser l'énergie de l'ATP on s'attendrait à ce que les vésicules de types sauvages se comportent comme les vésicules de mutants déficients en ATPase. Il en est bien ainsi. Les expériences montrent que les vésicules de types sauvages et de mutants incorporent la proline avec la même efficacité.

Synthèse du DNA

L'idée que le point réplicatif du chromosome bactérien est attaché à la membrane cellulaire a été émise tout d'abord par Jacob, Brenner et Cuzin en 1963 (54). Depuis lors un certain nombre d'études cytologiques ont montré un attachement entre la membrane cellulaire et le DNA bactérien, et il a été possible d'extraire un complexe DNA/membrane cellulaire (68, 69).

Les études effectuées dans le laboratoire de Ray Valentine montrant que l'ATPase intervenait dans les processus énergétiques membranaires anaérobiques il semblait possible qu'elle ait un rôle dans la synthèse anaérobique du DNA.

A vrai dire, nous avions primitivement essayé de déterminer si l'ATPase avait un rôle dans la production et la replication du DNA du phage T_4 à l'intérieur de E. coli. Ces expériences n'ont pu être poursuivies, car il apparaissait que, anaérobiquement, la réplication du DNA du phage T_4 ainsi que la production du phage étaient bloquées dans le type sauvage aussi bien que dans le mutant Aussi avons-nous observé le processus moins complexe de la réplication du DNA de la cellule hôte. Il est apparu en effet que la synthèse du DNA anaérobiquement est fortement inhibée dans le mutant unc⁻ 17.

A la suite de ces expériences il faudrait tester si la synthèse du RNA et la synthèse protéique sont également bloquées anaérobiquement dans les mutants. Le problème qui se pose ensuite est celui de trouver à quel niveau a lieu le blocage. On peut envisager des expériences permettant de déterminer si dans les mutants unc⁻ la production, le transport ou le maintien de quelque précurseur d'acide nucléique est bloqué anaérobiquement.

On peut également envisager de tester si l'ATPase est nécessaire pour produire un intermédiaire riche en énergie (similaire à celui de la phosphorylation oxydative) et relié directement avec la synthèse du DNA.

Il serait intéressant de reprendre les expériences sur le rôle de l'ATPase dans la production du phage T_4. Les souches sauvages et mutantes unc⁻ de E.coli ont très vraisemblalement besoin d'adapter leur métabolisme aux conditions anaérobiques afin de pouvoir produire des phages. Une telle hypothèse est difficile à vérifier, tout au moins pour le mutant, puisque ce mutant, comme on l'a vu ne pousse pas en anaérobiose. Il serait bien sûr interessant de vérifier cette hypothèse, sur le type sauvage. On peut également envisager une expérience où les types sauvages et mutants seraient adaptés aux conditions anaérobiques en présence de nitrate.

Il serait également très interessant d'entreprendre une étude biochimique du mutant unc⁻ 17. Différentes questions se posent :

1) L'ATPase est-elle présente sur la membrane interne du mutant unc⁻ 17 mais inactive ?
Pour résoudre ce problème on peut penser à des expériences de reconstitution d'activité par fixation d'ATPase de souches sauvages sur les membranes de mutants. On pourrait également analyser par chromatographie sur colonne le produit de lavage à faible force ionique des préparations membranaires de souches sauvages et mutantes (ce lavage solubilise l'ATPase membranaire (55,56)).

2) L'ATPase est un enzyme polyfonctionnel. Il catalyse la translocation de protons de part et d'autre de la membrane et il catalyse l'hydrolyse et la synthèse de l'ATP. Quelles sous unités effectuent ces différentes fonctions ? Ce problème pourrait être résolu par l'obtention de différents types de mutants. Les mutants déficients en ATPase sont relativement faciles à obtenir.

L'analyse des propriétés biologiques et biochimiques de tels mutants constitue un travail de très longue haleine.

Références bibliographiques hors articles.

1 - Lardy, H.A. and Ferguson, S.M. (1969) Ann. Rev. Biochem. 38, 991-1034.

2 - Racker, E. (1970) in "Menbranes of Mitochondria and Chloroplasts". F. Racker, ed. Van Nostrand Reinhold Co., New York. p. 127-171.

3 - Mitchell, P. (1966) Biol. Rev. (Cambridge) 41, 445-502.

4 - Greville, G.D. (1969) Curr. Top. Bioenerg. 3, 1-78.

5 - Skulachev, V.P. (1971) Curr. Top. Bioenerg. 4, 127-190.

6 - Mac. Lennan, D.H. (1970) Curr. Top. in Membranes Transport. Bronner, F. and Kleinzeller, A., eds. Academic Press, New York. vol. 1 p.177-232.

7 - Tzagoloff, A. (1971) Curr. Top. in Membranes Transport. Bronner, F. and Kleinzeller, A. eds. Academic Press, New York. vol. 2. p.157-205.

8 - Mitchell, P. and Moyle, J. (1967) Biochem. J. 105, 1147-1162.

9 - Hinkle, P.C. and Horstman, L.L. (1971) J. Biol. Chem. 246, 6024-6028.

10 - Penniston, J.T., Southard, J.H., Green, D.E. and Luzzana, M. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 142, 638-644.

11 - Mitchell, P. (1961) Nature 191, 144-148.

12 - Mitchell, P. (1967) Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 26, 1370-1379.

13 - Mitchell, P. (1969) in the Molecular Basis of Membrane Functions. Tostoson, D.C. ed. Prentice Hall Inc.Englewood Cliffs, N.J. p. 483-518.

14 - Lehninger, A.L. (1970) Biochem. J. 119, 129-138.

15 - Azzone, G.F. and Massari, S. (1973) Biochim. Biophys. Acta, 301, 195-226.

16 - Henderson, P.J.F. (1971) Annu. Rev. Microbiol. 25, 394-428.

17 - Hoek, J.B., Lofrumento, N.E., Meyer, A.J. and Tager, J.M. (1971) Biochim. Biophys. Acta, 226, 297-308.

18 - Klingenberg, M. (1970) Essays Biochem. 6, 119-159.

19 - Van Dam, K. and Meyer, A.J. (1971) Annu. Rev. Biochem. 40, 115-160.

20 - Slater, E.C. (1971) Quant. Rev. Biophys. 4, 35-72.

21 - Danielson, L. and Ernster, L. (1963) Biochem. Biophys. Res. Comm. 10, 91-101.

22 - Lehninger, A.L., Carafoli, E. and Rossi, C.S. (1967) Adv. Enzymol. 29, 259-320.

23 - Reid. R.A. (1970)Biochem. J. 116, 12P.

24 - Jagendorf, A.T. and Uribe, E. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 55, 170-177.

25 - Senior, A.E. (1973) Biochim. Biophys. Acta. 301, 249-277.

26 - Harold, F.M. (1972) Bacteriol. Rev. 36, 172-230.

27 - Slater, E.C. (1966) in "Comprehensive Biochemistry", M. Florkin and E.H. Stotz (eds), Elsevier, Amsterdam, vol. 14 p. 327-396.

28 - Storey, B.T. (1970) J. Theoret, Biol. 28, 233-259.

29 - Boyer, P.D. (1968) In Biological oxidations. T.P. Sanger (ed). Interscience Publishers, Inc., New York.

30 - Green, D.E., Asai, J., Harris, R.A. and Penniston, J.T. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 125, 684-705.

31 - Packer, L. (1970) Fed. Prod. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 29, 1533-1540.

32 - Young, J.H., Blondin,, G.A. and Green, D.E. (1971) Proc. Nat.Acad.Sci. USA. 68, 1364-1368.

33 - Harris, R.A., Penniston, J.T., Asai, J. and Green D.E. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 59, 830-837.

34 - Mitchell, P. (1968) Glynn Research Ltd., Bodmin, United Kingdom.

35 - Montal, M., Chance, B. and Lee, C.P. (1970) J. Membrane Biol. 2, 201-234.

36 - Racker, E. (1970) Essays Biochem. 6, 1- 22.

37 - Kagawa, Y. and Racker, E. (1971) J. Biol. Chem. 246, 5477-5487.

38 - Abram, D. (1965) J. Bacteriol. 89, 855-873.

39 -Munoz, E., Freer, J.H., Ellar, D.J. and Salton, M. R.J. (1968) Biochim. Biophys. Acta, 150, 531-533.

40 - Brodie, A.F. and Gutnick, D.L. (1972) in "Electron and coupled energy transfer in biological systems", King, T.E. and Klingerberg, M. ed. Marcel Dekker, New York. Vol. 1B p. 599-681.

41 - Horio, T. and Kamen, M.D. (1970) Annu. Rev. Microbiol. 24, 399-428.

42 - Smith, L. (1968) in "Biological oxydations", T.P. Singer (ed). Interscience, Publishers, New York. p. 55-122.

43 - Cole, H.A., Wimpenny, J.W.T. and Hughes , D.E. (1967) Biochim. Biophys. Acta 143, 445-453.

44 - Hempfling, W.P. (1970) Biochim. Biophys. Acta 205, 169-182.

45 - Harrison, D.E.F. and Loveless, J.E. (1971) J. Gen. Microbiol. 68, 35-43.

46 - Lawford, H.G. and Haddock, B.A. (1973) Biol. J. 136, 217- 220.

47 - Adolfsen,R. and Moudrianakis, E.N. (1971) Biochemistry, 10, 2247-2253.

48 - Ishikawa, S. (1966) J. Biochem. (Tokyo) 60, 598-601.

49 - Evans, D.J. Jr. (1969) J. Bacteriol. 100, 914-922.

50 - Evans, D.J. Jr. (1970) J. Bacteriol. 104, 1203-1212.

51 - Bogin, E., Higashi, T. and Brodie, A.F. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 478-483.

52 - Butlin, J.D., Cox, G.B. and Gibson, F. (1971) Biochem. J. 124, 75-81.

53 - Cox, G.B., Newton, N.A., Butlin, J.D., and Gibson, F. (1971) Biochem. J. 125, 489-493.

54 - Cox, G.B., Gibson, F., Mc. Cann, L.M., Butlin, J.D. and Crane, F.L. (1973) Biochem. J. 132, 689-695.

55 - Butlin, J.D., Cox, G.B. and Gibson, F. (1973) Biochim. Biophys. Acta, 292, 366-375.

56 - Cox, G.B., Gibson, F., Mc Cann, L. (1973) Biochem. J. 134, 1015-1021.
57 - Cox, G.B., Gibson, F. and Mc Cann, L. (1974) Biochem. J. 138, 211-215.
58 - Asano, A., Imai, K. and Sato, R. (1967) Biochim. Biophys. Acta, 143, 477-486.
59 - Fisher, R.J. and Sanadi, D.R. (1971) Biochim. Biophys. Acta 245, 34-41.
60 - Scholes, P. and Mitchell, P. (1970) J. Bioenerg. 1, 61-72.
61 - Scholes, P. and Mitchell, P. (1970) J. Bioenerg. 1, 309-323.
62 - Rosen, B.P. (1973) Biochim. Biophys. Res. Comm. 53, 1289-1296.
63 - West, I.C. and Mitchell, P. (1974) FEBS Letters, 40, 1-4.
64 - Hirata, H., Altendorf, K. and Harold, F.M. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70, 1804-1808.
65 - Hirata, H., Altendorf, K. and Harold, F.M. (1974) J. Biol. Chem. 249, 2939-2945.
66 - Hertzberg, E.L. and Hinkle, P.C. (1974) Biochem. Biophys. Res. Comm. 58, 178-184.
67 - Kaback, H.R. (1971) in Methods in Enzymology (Jacoby, W.B., ed.) vol. 22 p 99.
68 - Kaback, H.R. (1972) Biochim. Biophys. Acta, 265, 367-416.
69 - Jacob,F., Brenner, S. and Cuzin, I. (1963) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 329-348.
70 - Fields, K.L. and Luria, S.E. (1969) J. Bacteriol. 97, 57-63.
71 - Fields, K.L. and Luria, S.E. (1969) J. Bacteriol. 97, 64-77.
72 - Kanner, B.I. and Gutnick, D.L. (1972) J. Bacteriol. 111, 287-289.
73 - Cox, G.B. and Gibson, F. (1974) Biochim. Biophys. Acta, 346, 1-25.
74 - Gibson, F. and Cox, G.B. (1973) Essays Biochem., 9, 1-29.
75 - Simoni, R.D. and Shallenberger, M.K. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 2663-2667.
76 - Schairrer, H.U. and Haddock, B.A. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 544-551.
77 - Schairrer, H.U. and Gruber, D. (1973) Eur. J. Biochem. 37, 282-286.
78 - Gutnick, D.L. , Kanner, B.I. and Postma, P.W. (1972) Biochim. Biophys. Acta 283, 217-222.
79 - Hong, J.S. and Kaback, H.R. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 3336-3340.
80 - Kaback, H.R. and Stadtman, E.R. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 55, 920-927.
81 - Kaback, H.R. and Deuel, T.F. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 132, 118-129.
82 - Kaback, H.R. (1970) in "Current Topics in Membranes and Transport" Kleinzeller, A. and Bronner, F. eds, Academic Press, New York, vol. 1 p. 35.
83 - Short, S.A., Kaback, H.R., Kaczorowski, G., Fisher, J., Walsh, C.T. and Silverstein, S.C. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 5032-5036.

84 - Van Thienen, G. and Postma, P.W. (1973) Biochim. Biophys. Acta 323, 429-440

85 - Hare, J.F., Olden, K. and Kennedy, E.P. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4843-4846.

86 - Futai, M. (1974) J. Membrane Biol. 15, 15-28.

87 - Kaback, H.R. and Milner, L.S. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 66, 1008-1015.

88 - Yamamoto, T., Ninio, M. and Valentine, R.C. (1973) Biochim. Biophys. Acta, 314, 267-275.

89 - Amos, O.R., Kanner, B.I. and Gutnick, D.L. (1973) FEBS Letters, 35, 217-219.

90 - Larsen, S.H., Adler, J., Gargus, J.J. and Hogg, R.W. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S:A. 1239-1243.

91 - Thipayathasana, P. and Valentine, R.C. (1974) Biochim. Biophys. Acta, 347, 464-468.

92 - Jarett, L. and Hendler, R.W. (1967) Biochemistry, 6, 1693-1703.

93 - Beck, J.C., Mattoon, J.R., Hawthorne, D.G. and Sherman, F. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 60, 186-193.

94 - Kovac, L. and Hrusovska, E. (1968) Biochim. Biophys. Acta, 153, 43-54.

95 - Brooks, J.C. and Senior, A.E. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 147, 467-470.

96 - Nelson, N., Deters, D.W. , Nelson, H. and Racker, E. (1973) J. Biol. Chem. 248, 2049-2055.

97 - Salton, M.J.R. and Schor, M.T. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 350-356.

98 - Ebner, E. and Schatz, G. (1973) J. Biol. Chem. 248, 5379-5384.

99 - Roseman, S. (1969) J. Gen. Physiol., 59, 1385-1405.

100 - Kaback, H.R. and Barnes, E.M. (1971) J. Biol. Chem. 246, 5523-5531.

101 - Konings, W.N., and Kaback, H.R. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci; U.S.A. 70, 3376-3381.

102 - Singh, A.P. and Bragg, P.D. (1974) Biochem. Biophys. Res. Comm. 57, 1200-1206.

103 - Rosen, B.P. and Mc. Clees, J. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 5042-5046.

104 - Firshein, W. and Gillmor, R.G. (1970) Science, 169, 66-68.

105 - Fuchs, E. and Hanawalt, P. (1970) J. Mol. Biol. 52, 301-322.

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

PERMIS D'IMPRIMER

Doctorat D'ETAT

Thèse de SCIENCES-NATURELLES

Nom NINIO née MEVEL

Prénoms Maryvonne

Date et lieu de naissance 26 DECEMBRE 1942 VALOGNES/MANCHE

SUJET :

Thèse : 1° Propriétés structurales et fonctionnelles de dérivés du flavocytochrome b2. Association de hème et/ou FMN aux chaines combinées ou isolées. Rôle essentiel de l'ATPase membranaire de E. coli en anaérobiose comme facteur de couplage énergétique.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD ★ UNIVERSITÉ ORSAY

Vu et approuvé :

Orsay, le 28 AVRIL 1975

Les Membres du ~~Jury~~.

F. Labaye